

PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :
C07D 417/06, 493/04, C12P 17/08, A01N 43/78, A61K 31/425 // (C07D 493/04, 313:00, 303:00) **A1**
(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 98/22461**
(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 28. Mai 1998 (28.05.98)

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP97/06442**
(22) Internationales Anmeldedatum: 18. November 1997 (18.11.97)

(30) Prioritätsdaten:
196 47 580.5 18. November 1996 (18.11.96) **DE**
197 07 506.1 25. Februar 1997 (25.02.97) **DE**

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten außer US):
GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GFB) (DE/DE); Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **REICHENBACH, Hans (DE/DE); Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE). HÖFLE, Gerhard (DE/DE); Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE). GERTH, Klaus (DE/DE); Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE). STEINMETZ, Heinrich (DE/DE); Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE).**

(74) Anwälte: **BOETERS, Hans, D. usw.; Boeters & Baum, Buchranger 15, D-81541 München (DE).**

(81) Bestimmungsstaaten: **AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO Patent (OH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).**

Veröffentlicht

*Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.*

(54) Title: **EPOTHILONE C, D, E AND F, PRODUCTION PROCESS, AND THEIR USE AS CYTOSTATIC AS WELL AS PHYTOSANITARY AGENTS**

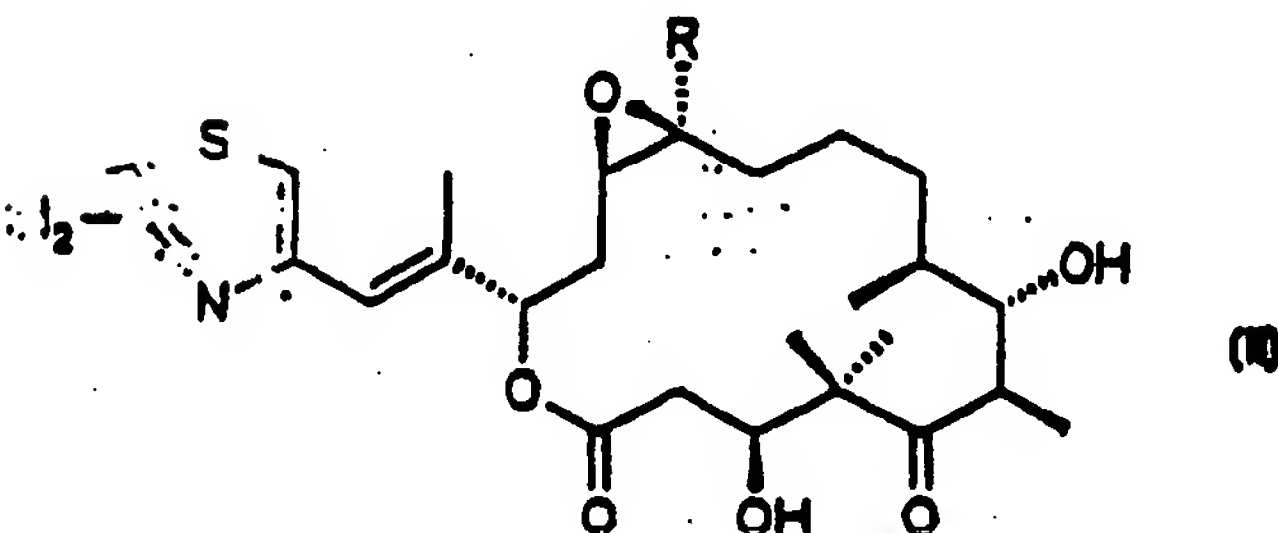
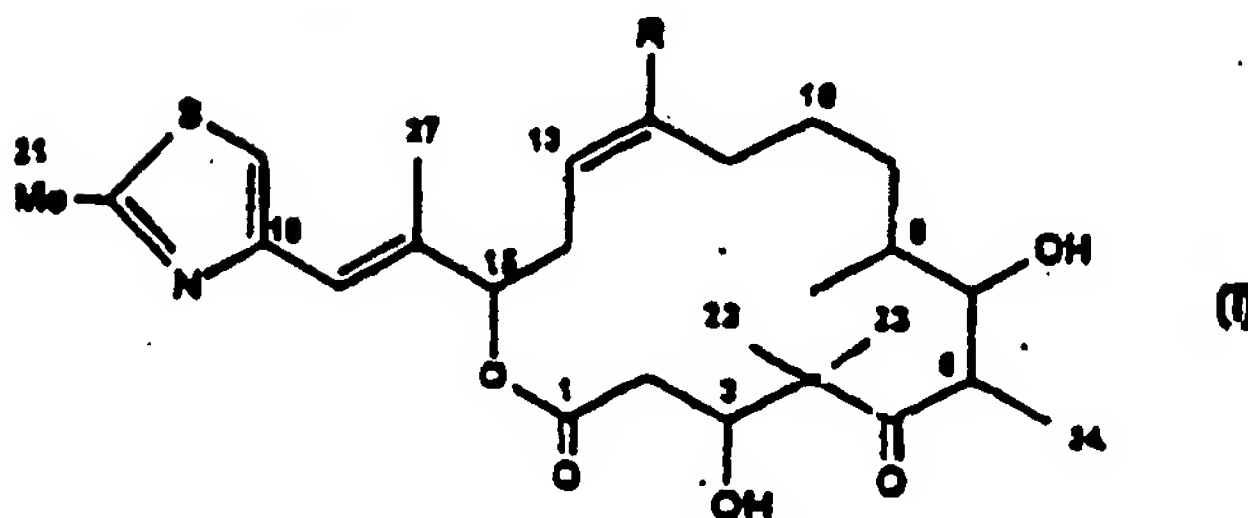
(54) Bezeichnung: **EPOTHILONE C, D, E UND F, DEREN HERSTELLUNG UND DEREN VERWENDUNG ALS CYTOSTATISCHE MITTEL BZW. ALS PFLANZENSCHUTZMITTEL**

(57) Abstract

The present invention concerns the epothilone, especially epothilone C (R = hydrogen) and epothilone D (R = methyl) of formula (I), as well as epothilone E (R = hydrogen) and epothilone F (R = methyl) of formula (II), the production process and their application for producing therapeutic agents, including cytostatic agents, as well as phytosanitary agents.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft Epothilone, insbesondere Epothilon C (R = Wasserstoff) und Epothilon D (R = Methyl) der Formel (I) sowie Epothilon E (R = Wasserstoff) und Epothilon F (R = Methyl) der Formel (II), deren Herstellung, sowie deren Verwendung zur Herstellung von therapeutischen, insbesondere cytostatischen Mitteln sowie Mitteln für den Pflanzenschutz.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäß dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SE	Schweden
AZ	Aserbaidschan	GB	Verinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TO	Togo
BB	Barbados	GR	Griechenland	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Gambia	ML	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GM	Gambia	MM	Myanmar	TR	Türkei
BG	Bulgarien	GU	Guam	MT	Malta	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	HT	Haiti	MU	Mauritius	UA	Ukraine
BR	Brasilien	HN	Honduras	MR	Mauritien	UG	Uganda
BT	Butan	IE	Irland	MW	Malawi	US	Verinigtes Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	MY	Malaysia	VE	Venezuela
CG	Kongo	KE	Kenia	NI	Nicaragua	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NP	Nepal	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CJ	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CK	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CL	Chile	LC	S. Lucia	RU	Russische Föderation		
CM	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	S. Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Litauen	SG	Singapur		
EE	Estland						

EPOTHILONE C, D, E UND F, DEREN HERSTELLUNG UND DEREN VERWENDUNG ALS CYTOSTATISCHE MITTEL BZW. ALS PFLANZENSCHUTZMITTEL

Die vorliegende Erfindung betrifft Epothilone C, D, E und F, deren Herstellung sowie deren Verwendung zur Herstellung von therapeutischen Mitteln und Mitteln für den Pflanzenschutz.

Epothilone C und D

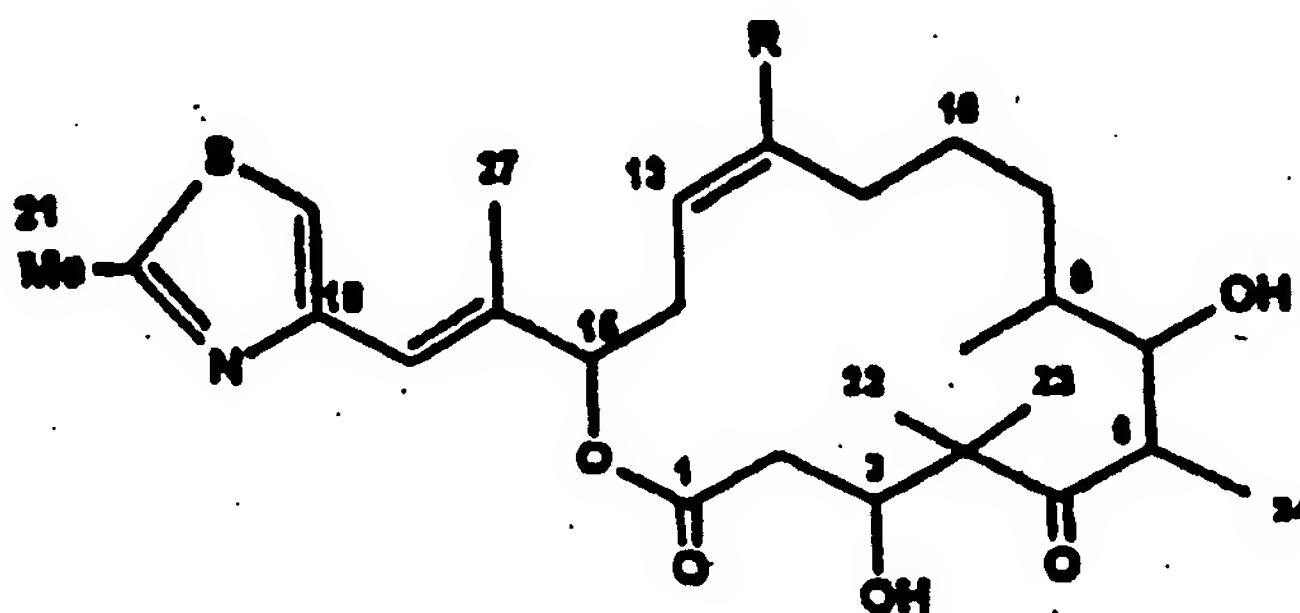
Gemäß einer Ausführungsform betrifft die Erfindung Epothilone (C und D), die dadurch gewinnbar sind, daß man

- (a) *Sorangium cellulosum* DSM 6773 in Gegenwart eines Adsorberharzes in an sich bekannter Weise kultiviert,
- (b) das Adsorberharz von der Kultur abtrennt und mit einem Wasser/Methanol-Gemisch wäscht,
- (c) das gewaschene Adsorberharz mit Methanol eluiert und das Eluat zu einem Rohextrakt einengt,

- (d) das gewonnene Konzentrat mit Ethylacetat extrahiert, den Extrakt einengt und zwischen Methanol und Hexan verteilt,
- (e) die methanolische Phase zu einem Raffinat einengt und das Konzentrat an einer Sephadex-Säule fraktioniert,
- (f) eine Fraktion mit Stoffwechselprodukten des eingesetzten Mikroorganismus gewinnt,
- (g) die gewonnene Fraktion an einer C18-Umkehrphase mit einem Methanol/Wasser-Gemisch chromatographiert und in zeitlicher Reihenfolge
- nach einer ersten Fraktion mit Epothilon A und
 - einer zweiten Fraktion mit Epothilon B
 - eine dritte Fraktion mit einem ersten weiteren Epothilon und
 - eine vierte Fraktion mit einem zweiten weiteren Epothilon gewinnt und
- (h1) und das Epothilon der ersten weiteren Fraktion und/oder
- (h2) das Epothilon der zweiten weiteren Fraktion isoliert.

Ferner betrifft die Erfindung ein Epothilon [C] der Summenformel $C_{26}H_{39}NO_5S$, gekennzeichnet durch das 1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1.

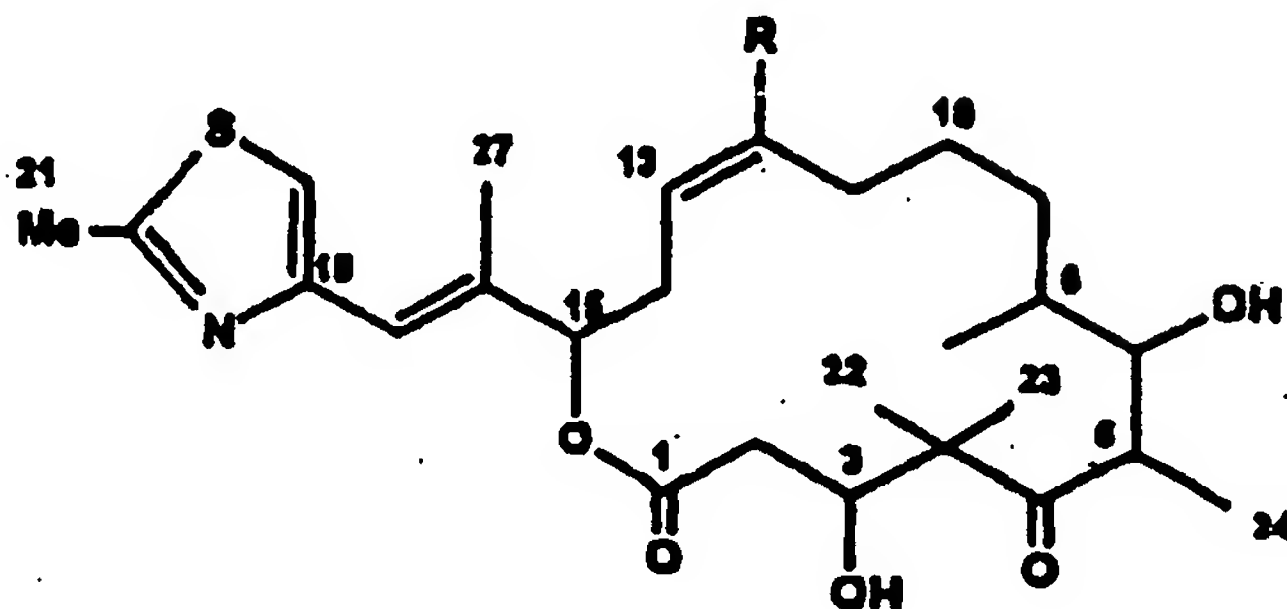
Ferner betrifft die Erfindung Epothilon C der Formel:



Epothilon C R = H

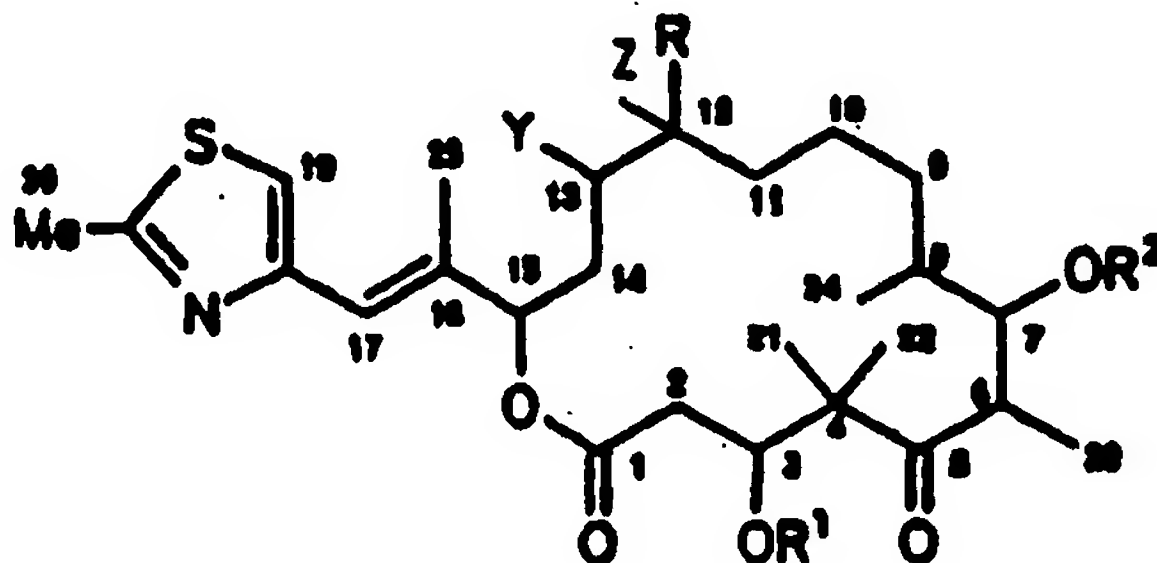
Ferner betrifft die Erfindung Epothilon (D) der Summenformel $C_{27}H_{41}NO_5S$, gekennzeichnet durch das 1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1.

Ferner betrifft die Erfindung Epothilon D der Formel:



Epothilon D $R = CH_3$

Epothilone C und D können zur Herstellung der Verbindungen der folgenden Formel 1 verwendet werden, wobei zu deren Derivatisierung auf die in WO-A-97/19 086 beschriebenen Derivatisierungsmethoden verwiesen werden kann.



In der vorstehenden Formel 1 bedeuten:

$R = H, C_{1-4}$ -Alkyl;
 $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 = H, C_{1-6}$ -Alkyl,

C₁₋₆-Acyl-Benzoyl,
C₁₋₄-Trialkylsilyl,
Benzyl,
Phenyl,
C₁₋₆-Alkoxy-,
C₆-Alkyl-, Hydroxy- und Halogen-
substituiertes Benzyl bzw. Phenyl;

wobei auch zwei der Reste R¹ bis R⁵ zu der Gruppierung -(CH₂)_n- mit n = 1 bis 6 zusammentreten können und es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt;

Y und Z sind entweder gleich oder verschieden und stehen jeweils für Wasserstoff, Halogen, wie F, Cl, Br oder J, Pseudohalogen, wie -NCO, -NCS oder -N₃, OH, O-(C₁₋₆)-Acyl, O-(C₁₋₆)-Alkyl, O-Benzoyl. Y und Z können auch das O-Atom eines Epoxides sein, wobei Epothilon A und B nicht beansprucht werden, oder eine der C-C-Bindungen einer C=C-Doppelbindung bilden.

So kann man die 12,13-Doppelbindung selektiv

- hydrieren, beispielsweise katalytisch oder mit Diimin, wobei man eine Verbindung der Formel 1 mit Y = Z = H erhält; oder
- epoxidieren, beispielsweise mit Dimethyldioxiran oder einer Persäure, wobei man eine Verbindung der Formel 1 mit Y mit Z = - O- erhält; oder
- in die Dihalogenide, Dipseudohalogenide oder Diazide umwandeln, wobei man eine Verbindung der Formel 1 mit Y und Z = Hal, Pseudo-hal oder N₃ erhält.

Epothilone E und F

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung einen Biotransformant von Epothilon A, der dadurch gewinnbar ist, daß man

- (a) *Sorangium cellulosum* DSM 6773 in Gegenwart eines Adsorberharzes in an sich bekannter Weise kultiviert, vom Adsorberharz abtrennt und gegebenenfalls die Gesamtmenge oder einen Teil der abgetrennten Kultur mit einer methanolischen Lösung von Epothilon A versetzt,
- (b) die mit Epothilon A versetzte Kultur inkubiert und danach mit Adsorberharz versetzt,
- (c) das Adsorberharz von der Kultur abtrennt, mit Methanol eluiert und das Eluat zu einem Rohextrakt einengt,
- (d) den Rohextrakt zwischen Ethylacetat und Wasser verteilt, die Ethylacetat-Phase abtrennt und zu einem Öl einengt,
- (e) das Öl an einer Umkehrphase unter folgenden Bedingungen chromatographiert:

Säulenmaterial: Nucleosil 100 C-18 7 μ m
Säulenmaße: 250 x 16 mm
Laufmittel: Methanol/Wasser = 60 : 40
Fluß: 10 ml/min

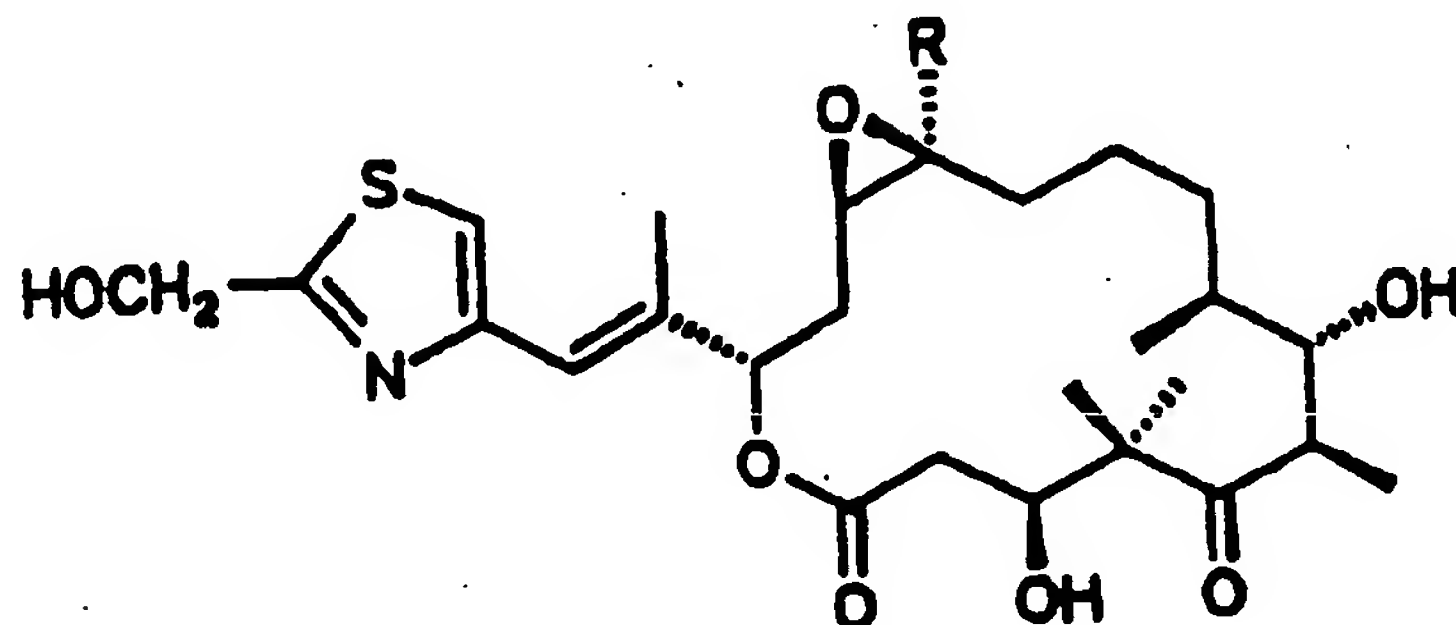
und Fraktionen mit einem Gehalt an Biotransformant, die sich durch UV-Löschung bei 254 nm detektieren lassen, mit einem R_t -Wert von 20 min abtrennt und den Biotransformanten isoliert.

Ferner betrifft die Erfindung einen derartigen Biotransformant von Epothilon A, der dadurch gewinnbar ist, daß man bei Stufe (a) eine Kultur abtrennt, die drei oder vier oder mehr Tage alt ist.

Ferner betrifft die Erfindung einen derartigen Biotransformant von Epothilon A, der dadurch gewinnbar ist, daß man bei Stufe (b) ein oder zwei oder mehr Tage inkubiert.

Ferner betrifft die Erfindung eine Verbindung der Summenformel $C_{26}H_{39}NO_7S$, gekennzeichnet durch folgendes 1H -NMR-Spektrum (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 2.38 (2- H_a), 2.51 (2- H_b), 4.17 (3-H), 3.19 (6-H), 3.74 (7-H), 1.30 - 1.70 (8-H, 9- H_2 , 10- H_2 , 11- H_2), 2.89 (12-H), 3.00 (13-H), 1.88 (14- H_a), 2.07 (14- H_b), 5.40 (15-H), 6.57 (17-H), 7.08 (19-H), 4.85 (21- H_2), 1.05 (22- H_3), 1.32 (23- H_3), 1.17 (24- H_3), 0.97 (25- H_3), 2.04 (27- H_3)

Ferner betrifft die Erfindung eine Verbindung (Epothilon E) der Formel:



Epothilon E R = H

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung einen Biotransformant von Epothilon B, der dadurch gewinnbar ist, daß man

- (a) *Sorangium cellulosum* DSM 6773 in Gegenwart eines Adsorberharzes in an sich bekannter Weise kultiviert, vom Adsorberharz abtrennt und gegebenenfalls die Gesamtmenge oder einen Teil der abgetrennten Kultur mit einer methanolischen Lösung von Epothilon B versetzt,

- (b) die mit Epothilon B versetzte Kultur inkubiert und danach mit Adsorberharz versetzt,
- (c) das Adsorberharz von der Kultur abtrennt, mit Methanol eluiert und das Eluat zu einem Rohextrakt einengt,
- (d) den Rohextrakt zwischen Ethylacetat und Wasser verteilt, die Ethylacetat-Phase abtrennt und zu einem Öl einengt,
- (e) das Öl an einer Umkehrphase unter folgenden Bedingungen chromatographiert:

Säulenmaterial: Nucleosil 100 C-18 7 μ m
Säulenmaße: 250 x 16 mm
Laufmittel: Methanol/Wasser = 60 : 40
Fluß: 10 ml/min

und Fraktionen mit einem Gehalt an Biotransformant, die sich durch UV-Löschung bei 254 nm detektieren lassen, mit einem R_t -Wert von 24,5 min abtrennt und den Biotransformanten isoliert.

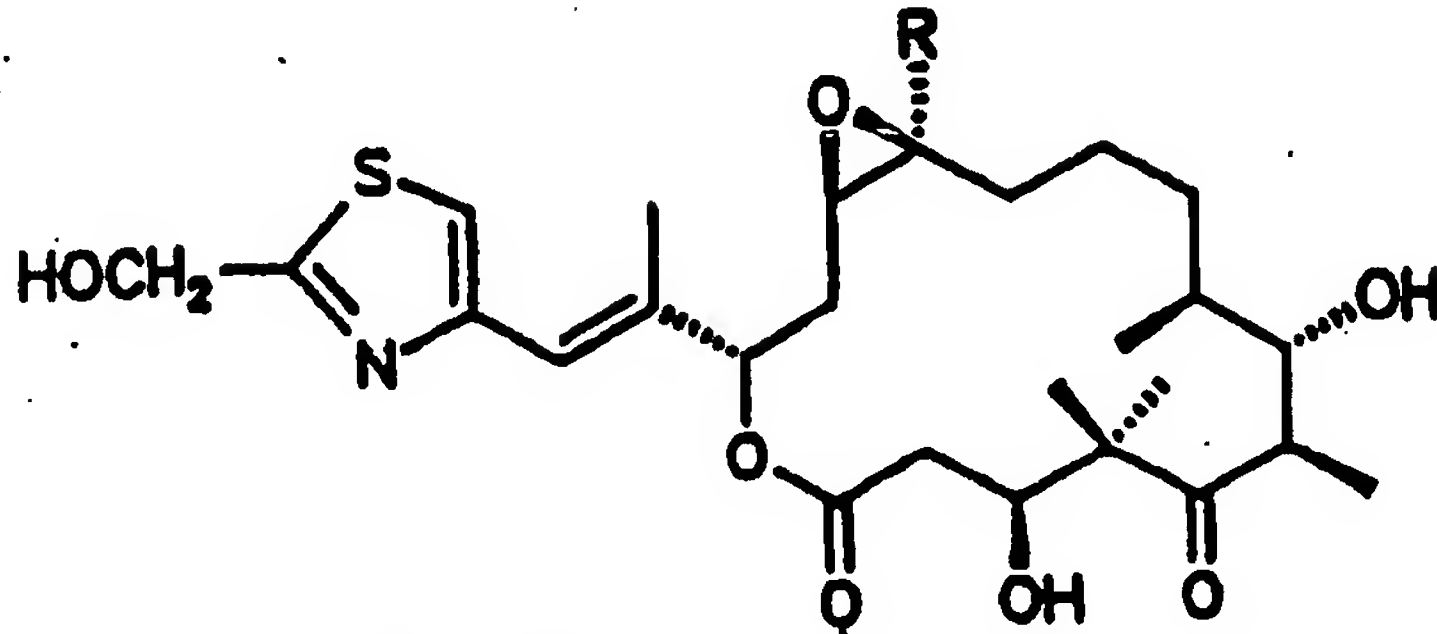
Ferner betrifft die Erfindung einen derartigen Biotransformant von Epothilon B, der dadurch gewinnbar ist, daß man bei Stufe (a) eine Kultur abtrennt, die drei oder vier oder mehr Tage alt ist.

Ferner betrifft die Erfindung einen derartigen Biotransformant von Epothilon B, der dadurch gewinnbar ist, daß man bei Stufe (b) ein oder zwei oder mehr Tage inkubiert.

Ferner betrifft die Erfindung eine Verbindung der Summenformel $C_{27}H_{41}NO_7S$, gekennzeichnet durch folgendes 1H -NMR-Spektrum (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 2.37 (2- H_a), 2.52 (2- H_b), 4.20 (3-H), 3.27 (6-H), 3.74 (7-H), 1.30 - 1.70 (8-H, 9- H_2 , 10- H_2 , 11- H_2), 2.78 (13-H), 1.91 (14-H), 2.06 (14- H_b), 5.42 (15-H), 6.58 (17-H),

7.10 (19-H), 4.89 (21-H₂), 1.05 (22-H₃), 1.26 (23-H₃), 1.14 (24-H₃), 0.98 (25-H₃), 1.35 (26-H₃), 2.06 (27-H₃).

Ferner betrifft die Erfindung eine Verbindung (Epothilon F) der Formel:



Epothilon F R = CH₃

Herstellung und Mittel

Die erfindungsgemäßen Verbindungen bzw. Epothilone sind mit den vorstehend angeführten Maßnahmen gewinnbar.

Die Erfindung betrifft ferner Mittel für den Pflanzenschutz in Landwirtschaft, Forstwirtschaft und/oder Gartenbau, bestehend aus einem oder mehreren der vorstehend aufgeführten Epothilone C, D, E und F bzw. bestehend aus einem oder mehreren der vorstehend aufgeführten Epothilone neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

Schließlich betrifft die Erfindung therapeutische Mittel, bestehend aus einer oder mehreren der vorstehend aufgeführten Verbindungen oder einer oder mehreren der vorstehend aufgeführten Verbindungen neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n). Diese Mittel können insbesondere cytotoxische Aktivitäten zeigen und/oder Immunsuppression bewirken.

und/oder zur Bekämpfung maligner Tumore eingesetzt werden, wobei sie besonders bevorzugt als Cytostatika verwendbar sind.

Die Erfindung wird im folgenden durch die Beschreibung von einigen ausgewählten Ausführungsbeispielen näher erläutert und beschrieben.

Beispiele

Beispiel 1:

Epothilone C und D

A. Produktionsstamm und Kulturbedingungen entsprechend dem Epothilon Basispatent DE-B-41 38 042.

B. Produktion mit DSM 6773

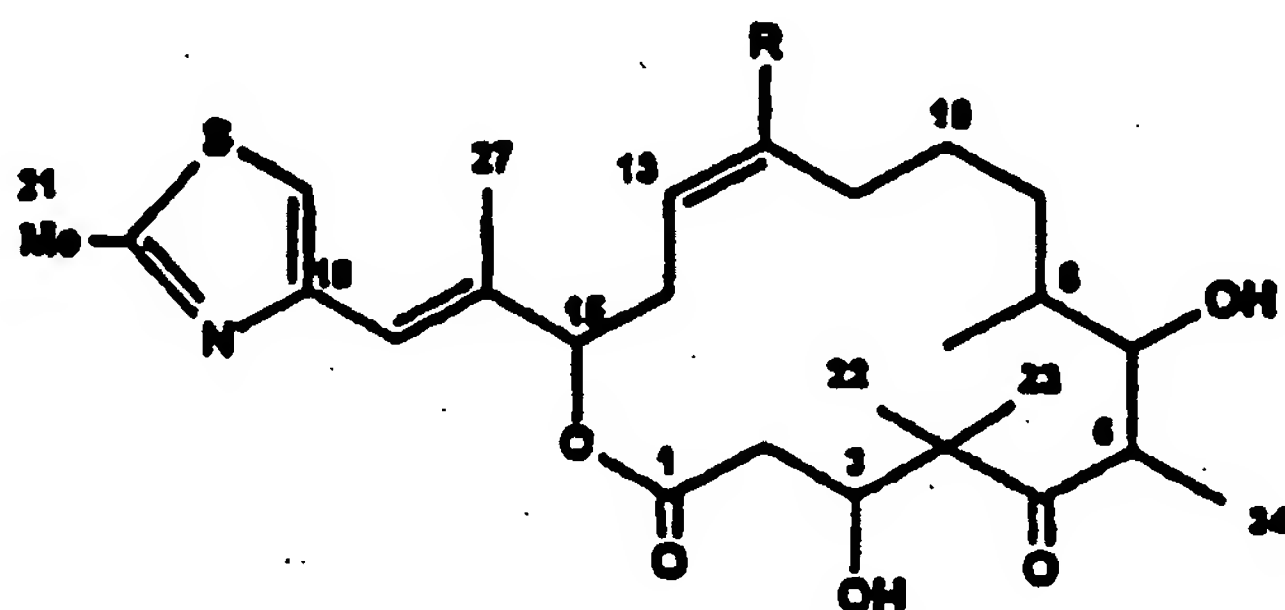
75 l Kultur werden wie im Basispatent beschrieben angezogen und zum Animpfen eines Produktionsfermenters mit 700 l Produktionsmedium aus 0.8 % Stärke, 0.2 % Glukose, 0.2 % Soya-mehl, 0.2 % Hefeextrakt, 0.1 % $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1 % $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 8 mg/l Fe-EDTA, pH = 7.4 und optional 15 l Adsorberharz Amberlite XAD-16 verwendet. Die Fermentation dauert 7 - 10 Tage bei 30 C, Belüftung mit 0.1 NL/m³. Durch Regulierung der Drehzahl wird der pO_2 bei 30 % gehalten.

C. Isolierung

Das Adsorberharz wird mit einem 0.7 m², 100 mesh Prozeßfilter von der Kultur abgetrennt und durch Waschen mit 3 Bettvolumen Wasser/Methanol 2:1 von polaren Begleitstoffen befreit. Durch 4 Bettvolumen Methanol wird ein Rohextrakt gewonnen, der i. Vak. bis zum Auftreten der Wasserphase eingedampft wird.

Diese wird dreimal mit dem gleichen Volumen Ethylacetat extrahiert. Eindampfen der organischen Phase ergibt 240 g Rohextrakt, der zwischen Methanol und Heptan verteilt wird, um lipophile Begleitstoffe abzutrennen. Aus der Methanolphase werden durch Eindampfen i. Vak. 180 g Raffinat gewonnen, das in drei Portionen über Sephadex LH-20 (Säule 20 x 100 cm, 20 ml/min Methanol) fraktioniert wird. Die Epothilone sind in der mit 240 - 300 min Retentionszeit eluierten Fraktion von insgesamt 72 g enthalten. Zur Trennung der Epothilone wird in drei Portionen an Lichrosorb RP-18 (15 μ m, Säule 10 x 40 cm, Laufmittel 180 ml/min Methanol/Wasser 65:35) chromatographiert. Nach Epothilon A und B werden mit R_t = 90-95 min Epothilon C und 100-110 min Epothilon D eluiert und nach Eindampfen i. Vak. in einer Ausbeute von jeweils 0.3 g als farblose Öle gewonnen.

D. Physikalische Eigenschaften



Epothilon C R = H
Epothilon D R = CH₃

Epothilon C

C₂₆H₃₉NO₅S [477]

ESI-MS: (M+H)⁺: 478.5 für [M+H]⁺

¹H und ¹³C siehe NMR-Tabelle

DC:R_f = 0,82

DC-Alufolie 60 F 254 Merck, Laufmittel: Dichlormethan/Methanol =
9:1

Detektion: UV-Löschung bei 254 nm. Ansprühen mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz, blau-graue Anfärbung beim Erhitzen auf 120 °C.

HPLC:R_t = 11,5 min

Säule: Nucleosil 100 C-18 7µm, 125 x 4 mm

Laufmittel: Methanol/Wasser = 65:35

Fluß: 1ml/min

Detection: Diodenarray

Epothilon D

C₂₇H₄₁NO₅S [491]

ESI-MS: (positiv Ionen): 492,5 für [M+H]⁺

¹H und ¹³C siehe NMR-Tabelle

DC:R_f = 0,82

DC-Alufolie 60 F 254 Merck, Laufmittel: Dichlormethan/Methanol =
9:1

Detektion: UV-Löschung bei 254 nm. Ansprühen mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz, blau-graue Anfärbung beim Erhitzen auf 120 °C.

HPLC:R_t = 15,3 min

Säule: Nucleosil 100 C-18 7µm, 125 x 4 mm

Laufmittel: Methanol/Wasser = 65:35

Fluß: 1ml/min

Detection: Diodenarray

Tabelle 1: ^1H - und ^{13}C -NMR Daten von Epothilon C und Epothilon D in $[\text{D}_6]$ DMSO bei 300 MHz

Epothilon C				Epothilon D		
H-Atom	δ (ppm)	C-Atom	δ (ppm)	δ (ppm)	C-Atom	δ (ppm)
		1	170.3		1	170.1
2-Ha	2.38	2	38.4	2.35	2	39.0
2-Hb	2.50	3	71.2	2.38	3	70.8
3-H	3.97	4	53.1	4.10	4	53.2
3-OH	5.12	5	217.1	5.08	5	217.4
6-H	3.07	6	45.4	3.11	6	44.4
7-H	3.49	7	75.9	3.48	7	75.5
7-OH	4.46	8	35.4	4.46	8	36.3
8-H	1.34	9	27.6	1.29	9	29.9
9-Ha	1.15	10	30.0	1.14	10	25.9
9-Hb	1.40	11	27.6	1.38	11	31.8*
10-Ha	1.15*	12	124.6	2.14*	12	138.3
10-Hb	1.35*	13	133.1	1.35*	13	120.3
11-Ha	1.90	14	31.1	1.75	14	31.6*
11-Hb	2.18	15	76.3	2.10	15	76.6
12-H	5.38**	16	137.3		16	137.2
13-H	5.44**	17	119.1	5.08	17	119.2
14-Ha	2.35	18	152.1	2.30	18	152.1
14-Hb	2.70	19	117.7	2.65	19	117.7
15-H	5.27	20	164.2	5.29	20	164.3
17-H	6.50	21	18.8	6.51	21	18.9
19-H	7.35	22	20.8	7.35	22	19.7
21-H ₁	2.65	23	22.6	2.65	23	22.5
22-H ₁	0.94	24	16.7	0.90	24	16.4
23-H ₁	1.21	25	18.4	1.19	25	18.4
24-H ₁	1.06	27	14.2	1.07	26	22.9
25-H ₁	0.90			0.91	27	14.1
26-H ₁				1.63		
27-H ₁	2.10			2.11		

*, ** Zuordnung vertauschbar

Beispiel 2:**Epothilon A und 12,13-Bisepi-epothilon A aus Epothilon C**

50 mg Epothilon A werden in 1.5 ml Aceton gelöst und mit 1.5 ml einer 0.07 molaren Lösung von Dimethyldioxiran in Aceton versetzt. Nach 6 Stunden Stehen bei Raumtemperatur wird i. Vak. eingedampft und durch präparative HPLC an Kieselgel (Laufmittel: Methyl-tert.butylether/Petrolether/Methanol 33:66:1) getrennt.

Ausbeute:

25 mg Epothilon A, $R_t = 3,5$ min (analyt. HPLC, 7 μ m, Säule 4 x 250 mm, Laufmittel s. o., Fluß 1.5 ml/min)

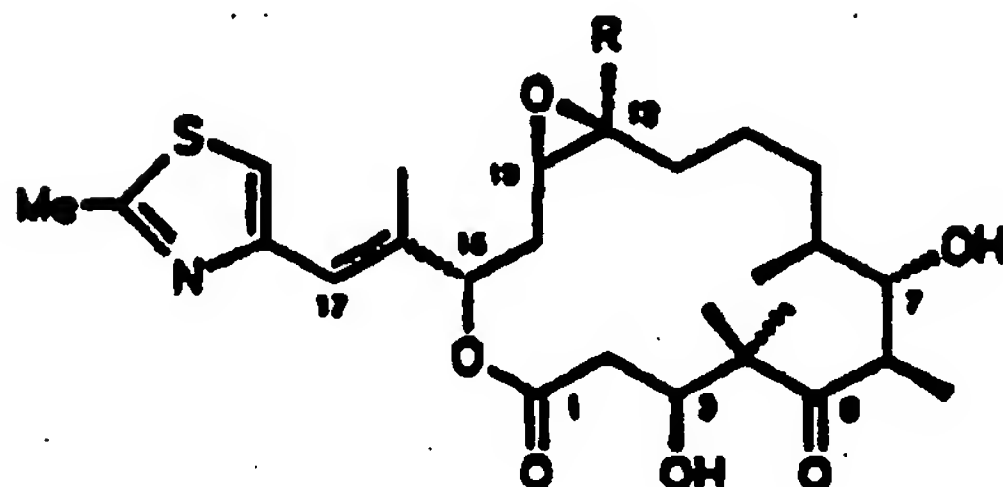
und

20 mg 12,13-Bisepi-epothilon A, $R_t = 3.7$ min, ESI-MS (pos. Ionen)

$m/z = 494 [M+H]^+$

1H -NMR in $[D_4]$ Methanol, ausgewählte Signale: $\delta = 4.32$

(3-H), 3.79 (7-H), 3.06 (12-H),
3.16 (13-H), 5.54 (15-H), 6.69
(17-H), 1.20 (22-H), 1.45 (23-H).



12,13-Bisepi-epothilon A R = H

Beispiel 3:

Epothilon E und F, neue Biotransformationsprodukte der Epothilone A und B.

Produktionsstamm:

Der Produktionsstamm *Sorangium cellulosum* So ce90 wurde im Juli 1985 an der GBF aus einer Bodenprobe von den Ufern des Zambesi isoliert und am 28.10.91 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen unter Nr. DSM 6773 hinterlegt.

Die Charakterisierung des Produzenten sowie die Kulturbedingungen sind beschrieben in:

Höfle, G.; N. Bedorf, K. Gerth & H. Reichenbach: Epothilone, deren Herstellungsverfahren sowie sie enthaltende Mittel.
DE 41 38 042 A1, offengelegt am 27. Mai 1993.

Bildung der Epothilone E und F während der Fermentation:

Eine typische Fermentation verläuft folgendermaßen: Ein 100 l Bioreaktor wird mit 60 l Medium (0,8 % Stärke; 0,2 % Glucose; 0,2 % Soyamehl; 0,2 % Hefeextrakt; 0,1 % $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 0,1 % $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 8 mg/l Fe-EDTA; pH 7,4) gefüllt. Zusätzlich werden 2 % Adsorberharz (XAD-16, Rohm & Haas) zugegeben. Das Medium wird durch Autoklavieren (2 Std., 120 °C) sterilisiert. Beimpft wird mit 10 l einer im gleichen Medium (zusätzlich 50 mM HEPES-Puffer pH 7,4) im Schüttelkolben angezogenen Vorkultur (160 Upm, 30 °C). Fermentiert wird bei 32 °C mit einer Rührergeschwindigkeit von 500 Upm und einer Belüftung von 0,2 Nl pro m^3 und Std, der pH Wert wird durch Zugabe von KOH bei 7,4 gehalten. Die Fermentation dauert 7 bis 10 Tage. Die gebildeten Epothilone werden während der Fermentation kontinuierlich an das Adsorberharz gebunden. Nach Abtrennen der Kulturbrühe (z. B. durch Zentrifugieren in einem Prozeßfilter) wird das Harz mit 3 Bettvolumen Wasser gewaschen.

schen und mit 4 Bettvolumen Methanol eluiert. Das Eluat wird zur Trockne eingeeengt und in 700 ml Methanol aufgenommen.

HPLC-Analyse des XAD-Eluates:

Gegenüber dem Ausgangsvolumen des Reaktors (70 l) ist das Eluat 100:1 konzentriert. Die Analyse wird durchgeführt mit einer HPLC Anlage 1090 der Fa. Hewlett Packard. Zur Trennung der Inhaltsstoffe wird eine Microbore Säule (125/2 Nucleosil 120-5 C₁₈) der Fa. Machery-Nagel (Düren) verwendet. Eluiert wird mit einem Gradienten aus Wasser/Acetonitril von anfänglich 75:25 bis zu 50:50 nach 5,5 Minuten. Dieses Verhältnis wird bis zur 7. Minute gehalten, um dann bis zur 10. Minute auf 100 % Acetonitril anzuheben.

Gemessen wird bei einer Wellenlänge von 250 nm und einer Bandbreite von 4 nm. Die Dioden Array Spektren werden im Wellenlängenbereich von 200 bis 400 nm gemessen. Im XAD-Eluat fallen zwei neue Substanzen mit R_t 5,29 und R_t 5,91 auf, deren Adsorptionsspektren mit denen von Epothilonen A bzw. B identisch sind (Abb. 1; E entspricht A, F entspricht B). Diese Substanzen werden unter den gegebenen Fermentationsbedingungen nur in Spuren gebildet.

Biotransformation von Epothilon A und B zu Epothilon E und F:

Für die gezielte Biotransformation wird eine 4 Tage alte, mit Adsorberharz gehaltene 500 ml Kultur von So ce90 verwendet. Von dieser werden 250 ml unter Zurücklassen des XAD in einen sterilen 1 l Erlenmeyerkolben überführt. Danach wird eine methanolische Lösung einer Mischung von insgesamt 36 mg Epothilon A und 14 mg Epothilon B zugegeben und der Kolben für zwei Tage bei 30 °C und 200 Upm auf einer Schütteltruhe inkubiert. Die Bildung der Epothilone E und F wird direkt aus 10 µl des zentrifugierten Kulturüberstands analysiert (Abb. 2). Die Umwandlung erfolgt nur

in Gegenwart der Zellen und ist abhängig von der eingesetzten Zelldichte und der Zeit. Eine Kinetik der Umwandlung ist für Epothilon A in Abb. 3 dargestellt.

Isolierung von Epothilon E und F

Zur Isolierung von Epothilon E und F werden drei Schüttelkolbenansätze aus der Biotransformation (s. o.) vereinigt und 1 h mit 20 ml XAD-16 geschüttelt. Das XAD wird durch Absieben gewonnen und mit 200 ml Methanol eluiert. Das Eluat wird i. Vak. zu 1.7 g Rohextrakt eingedampft. Dieser wird zwischen 30 ml Ethylacetat und 100 ml Wasser verteilt. Aus der Ethylacetatphase werden beim Eindampfen i. Vak. 330 mg eines öligen Rückstandes erhalten, die in fünf Läufen über eine 250 x 20 mm RP-18 Säule chromatographiert werden (Laufmittel: Methanol/Wasser 58:42, Detektion 254 nm).

Ausbeute: Epothilon E 50 mg
F 10 mg

Biologische Wirkung von Epothilon E:

In Zellkulturen wurde die Konzentration bestimmt, welche das Wachstum um 50 % reduziert (IC₅₀) und mit den Werten für Epothilon A verglichen.

<u>Zelllinie</u>	<u>IC₅₀ (ng/ml)</u>	
	<u>Epothilon E</u>	<u>Epothilon A</u>
HeLa, KB-3.1 (human) Mausfibroblasten, L929	5	1
	20	4

Epothilon E

$C_{26}H_{39}NO_7S$ [509]

ESI-MS: (positiv Ionen): 510.3 für $[M+H]^+$

DC: $R_f = 0,58$

DC-Alufolie 60 F 254 Merck. Laufmittel: Dichlormethan/Methanol = 9:1

Detektion: UV-Löschung bei 254 nm.. Ansprühen mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz, blau-graue Anfärbung beim Erhitzen auf 120 °C

HPLC: $R_t = 5,0$ min

Säule: Nucleosil 100 C-18 7µm, 250 x 4 mm

Laufmittel: Methanol/Wasser = 60:40

Fluß: 1,2 ml/min

Detektion: Diodenarray

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 2.38 (2- H_a), 2.51 (2- H_b), 4.17 (3-H), 3.19 (6-H), 3.74 (7-H), 1.30 - 1.70 (8-H, 9- H_2 , 10- H_2 , 11- H_2), 2.89 (12-H), 3.00 (13-H), 1.88 (14- H_a), 2.07 (14- H_b), 5.40 (15-H), 6.57 (17-H), 7.08 (19-H), 4.85 (21- H_2), 1.05 (22- H_3), 1.32 (23- H_3), 1.17 (24- H_3), 0.97 (25- H_3), 2.04 (27- H_3)

Epothilon F

$C_{27}H_{41}NO_7S$ [523]

ESI-MS: (positiv Ionen): 524.5 für $[M+H]^+$

DC: $R_f = 0,58$

DC-Alufolie 60 F 254 Merck. Laufmittel: Dichlormethan/Methanol = 9:1

Detektion: UV-Löschung bei 254 nm. Ansprühen mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz, blau-graue Anfärbung beim Erhitzen auf 120 °C.

HPLC: $R_t = 5,4$ min

Säule: Nucleosil 100 C-18 $7\mu\text{m}$, 250×4 mm

Laufmittel: Methanol/Wasser = 60:40

Fluß: 1,2 ml/min

Detektion: Diodenarray

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.37$ (2- H_a), 2.52 (2- H_b), 4.20 (3-H), 3.27 (6-H), 3.74 (7-H), 1.30 - 1.70 (8-H, 9- H_2 , 10- H_2 , 11- H_2), 2.78 (13-H), 1.91 (14-H), 2.06 (14- H_b), 5.42 (15-H), 6.58 (17-H), 7.10 (19-H), 4.89 (21- H_2), 1.05 (22- H_3), 1.26 (23- H_3), 1.14 (24- H_3), 0.98 (25- H_3), 1.35 (26- H_3), 2.06 (27- H_3).

Beispiel 4:

Herstellung von Epothilon B und F durch Biotransformation mit *Sorangium cellulosum* So ce90

1) Durchführung der Biotransformation:

Für die Biotransformation wird eine Kultur von *Sorangium cellulosum* So ce90 verwendet, die für vier Tage in Gegenwart von 2 % XAD 16 Adsorberharz (Fa. Rohm und Haas, Frankfurt/M.) bei 30 °C und 160 Upm geschüttelt wurde. Das Kulturmedium hat folgende Zusammensetzung in g/Liter destilliertem Wasser: Kartoffelstärke (Maizena), 8; Glucose (Maizena), 8; entfettetes Sojamehl, 2; Hefeextrakt (Marcor), 2; Ethylendiamintetraessigsäure, Eisen (III) Natrium Salz, 0,008; $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 1; $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 1; HEPES 11,5. Der pH-Wert wird vor dem Autoklavieren mit KOH auf 7,4 eingestellt. Das XAD wird durch Sieben über ein Edelstahl-sieb (200 μm Maschenweite) von der Kultur abgetrennt. Die Bakterien werden durch Zentrifugation für 10 min bei 10 000 Upm sedimentiert und das Pellet in 1/5 des Kulturüberstandes resuspendiert und das Pellet in 1/5 des Kulturüberstandes resuspendiert. Zu der konzentrierten Bakteriensuspension wird nun Epothilon A bzw. Epothilon B in methanolischer Lösung in einer Kon-

zentration von 0,5 g/Liter zugesetzt. Die Kultur wird wie oben beschrieben weiterkultiviert. Zur Analyse der Biotransformation wird zu den gewünschten Zeiten eine 1 ml Probe entnommen, 0,1 ml XAD zugegeben und die Probe für 30 min bei 30 °C geschüttelt. Eluiert wird das XAD mit Methanol. Das Eluat wird zur Trockene eingeeengt und in 0,2 ml Methanol wieder aufgenommen. Diese Probe wird über HPLC analysiert.

Abb. 4) Kinetik der Biotransformation von Epothilon A nach Epothilon E

Abb. 5) Kinetik der Biotransformation von Epothilon B nach Epothilon F.

2) Herstellung von Epothilon E durch Biotransformation von 1 g Epothilon A.

Der Stamm *Sorangium cellulosum* So ce90 wird für vier Tage in 8,5 l des obigen Mediums (jedoch ohne XAD Zusatz) in einem 10 Liter Bioreaktor bei 30 °C, einer Drehzahl von 150 Upm und einer Belüftung von 0,1 vvm angezogen.

Anschließend wird die Kultur durch cross flow Filtration auf 3 l eingeeengt. Hierzu werden 0,6 m² einer Membran mit einer Porengröße von 0,3 µm verwendet.

Die konzentrierte Kultur wird in einen 4 Liter Bioreaktor überführt und eine methanolische Lösung von 1 g Epothilon A in 10 ml Methanol zugegeben. Anschließend wird die Kultur über einen Zeitraum von 21,5 h weiterkultiviert. Die Temperatur beträgt 32 °C, die Rührerdrehzahl 455 Upm und die Belüftung erfolgt mit 6 l/min. Zum Erntezeitpunkt wird 100 ml XAD zugegeben und für 1 h weiterinkubiert. Das XAD wird durch Absieben von den Zellen abgetrennt und erschöpfend mit Methanol eluiert. Das konzentrierte Eluat wird über HPLC analysiert.

Bilanzierung der Biotransformation:

Epothilon A eingesetzt:	1000 mg	= 100 %
Epothilon A nach 21,5 h wiedergefunden:	53,7 mg	= 5,4 %
Epothilon E nach 21,5 h gebildet:	661,4 mg	= 66,1 %
Epothilon A vollständig abgebaut:		= 28,5 %

Versuch 5:

Die erfindungsgemäßen Epothilone wurden mit Zellkulturen (Tabelle 2) und auf Polymerisationsförderung (Tabelle 3) getestet.

Tabelle 2:

Epothilon-Tests mit Zellkulturen

Epothilon	A 493	B 507 IC-50	C 477 [ng/ml]	D 491	E 509	F 523
Mausfibroblasten L 929	4	1	100	20	20	1,5
<u>humane Tumorzelllinien:</u>						
HL-60 (Leukämie)	0.2	0.2	10	3	1	0,3
K-562 (Leukämie)	0.3	0.3	20	10	2	0,5
U-937 (Lymphom)	0.2	0.2	10	3	1	0,2
KB-3.1 (Cervixkarzinom)	1	0.6	20	12	5	0,5
KB-V1 (Cervixkarzinom multires)	0.3	0.3	15	3	5	0,6
A-498 (Nierenkarzinom)	-	1.5	150	20	20	3
A-549 (Lungenkarzinom)	0.7	0.1	30	10	3	0,1

Tabelle 3:

Polymerisationstest mit Epothilonen

Parameter: Zeit bis zur halbmaximalen Polymerisation der Kontrolle

Messung:	w	x	y	z	Mittel	Mittel
					[s]	[%]
Kontrolle	200	170	180	210	190	100
Epothilon A	95	60	70	70	74	39
Epothilon B		23	25	30	26	14
Epothilon C	125	76	95	80	94	49
Epothilon D	125	73	120		106	56
Epothilon E	80	60	50	45	59	31
Epothilon F	80	40	30	50	50	26


Standardtest mit 0,9 mg Tubulin/ml und 1 μ M Probenkonzentration

Der Polymerisationstest ist ein in vitro Test mit gereinigtem Tubulin aus Schweinehirn. Die Auswertung erfolgt photometrisch. Polymerisationsfördernde Substanzen wie die Epothilone verkürzen die Zeit, bis zu der halbmaximale Polymerisation erfolgt ist, d. h., je kürzer die Zeit, desto wirksamer die Verbindung. w, x, y und z sind vier unabhängige Versuche, die relative Wirksamkeit ist in der letzten Spalte in % der Kontrolle ausgedrückt; wieder zeigen die niedrigsten Werte die beste Wirksamkeit an. Die Rangliste entspricht ziemlich genau der in Zellkulturen festgestellten.

**BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE
INTERNATIONAL FORM**

Gesellschaft für
Biotechnologische
Forschung mbH
Mascheroder Weg 1
3300 Braunschweig

VIABILITY STATEMENT
issued pursuant to Rule 18.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR	II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH Address: Mascheroder Weg 1 3300 Braunschweig	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 6773 Date of the deposit or of the transfer ¹ : 1991-10-28
III. VIABILITY STATEMENT	
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 1991-10-28. ² On that date, the said microorganism was (X) ³ viable () ³ no longer viable	
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED⁴	
IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DEM DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1 B D-3300 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: 1991-11-05


- ¹ Indicate the date of origin or, where deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).
- ² In the cases referred to in Rule 18.2(a) (i) and (ii), refer to the most recent viability test.
- ³ Mark with a cross the applicable box.
- ⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

**BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE**

INTERNATIONAL FORM

Gesellschaft für
Biotchnologische
Forschung mbH
Mascheroder Weg 1
3300 Braunschweig

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification references given by the DEPOSITOR So ce 90	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 6773
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: () a scientific description (X) a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts this microorganism identified under I. above, which was received by it on 1991-10-28 (Date of original deposit) ¹	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I. above was received by this International Depositary Authority on (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSM-DEUTSCHE SAMMLUNG MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1 B D-3300 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: 1991-11-05

¹ When Rule 6.1(c) applies, each date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

Patentansprüche

1. Epothilone, dadurch gewinnbar, daß man

- (a) *Sorangium cellulosum* DSM 6773 in Gegenwart eines Adsorberharzes in an sich bekannter Weise kultiviert,
- (b) das Adsorberharz von der Kultur abtrennt und mit einem Wasser/Methanol-Gemisch wäscht,
- (c) das gewaschene Adsorberharz mit Methanol eluiert und das Eluat zu einem Rohextrakt einengt,
- (d) das gewonnene Konzentrat mit Ethylacetat extrahiert, den Extrakt einengt und zwischen Methanol und Hexan verteilt,
- (e) die methanolische Phase zu einem Raffinat einengt und das Konzentrat an einer Sephadex-Säule fraktioniert,
- (f) eine Fraktion mit Stoffwechselprodukten des eingesetzten Mikroorganismus gewinnt,
- (g) die gewonnene Fraktion an einer C18-Umkehrphase mit einem Methanol/Wasser-Gemisch chromatographiert und in zeitlicher Reihenfolge

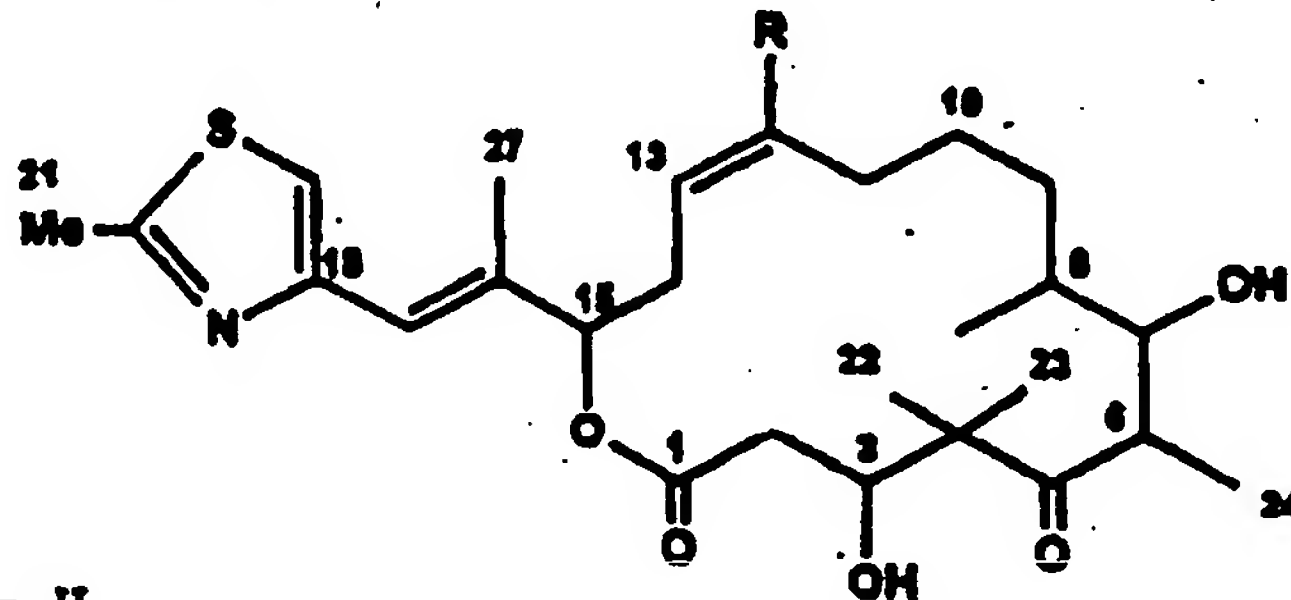
-
- nach einer ersten Fraktion mit Epothilone A und
 - einer zweiten Fraktion mit Epothilone B

- eine dritte Fraktion mit einem ersten weiteren Epothilon und
- eine vierte Fraktion mit einem zweiten weiteren Epothilon gewinnt und

(h1) und das Epothilon der ersten weiteren Fraktion und /oder
 (h2) das Epothilon der zweiten weiteren Fraktion isoliert.

2. Epothilon der Summenformel $C_{26}H_{39}NO_5S$, gekennzeichnet durch das 1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1.

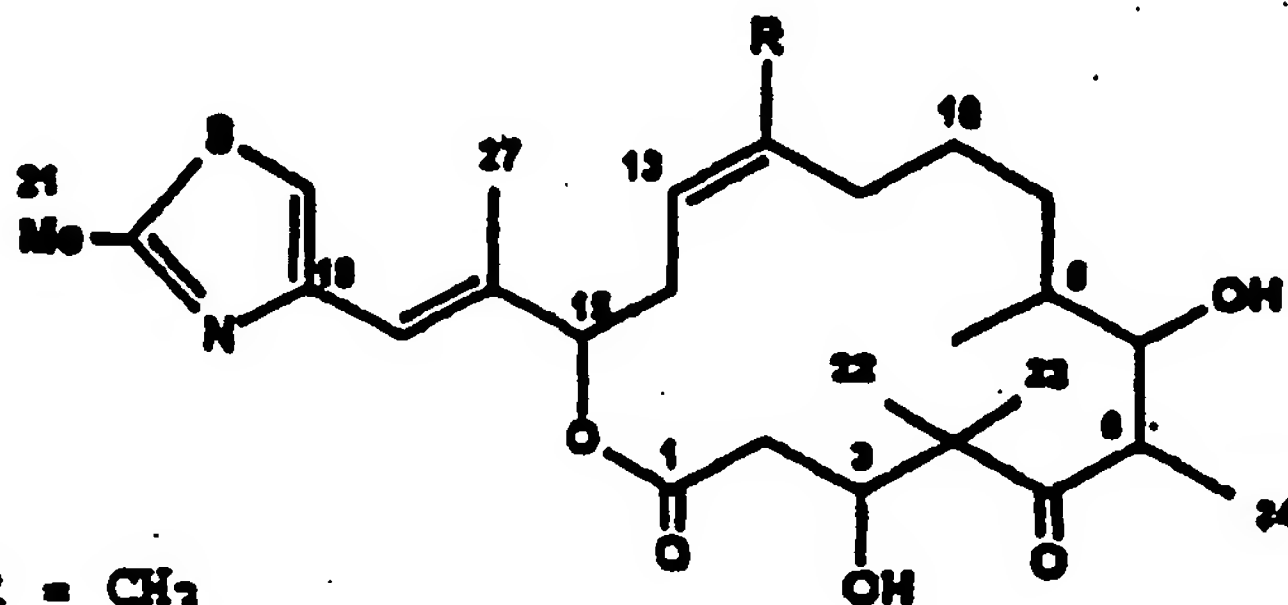
3. Epothilon C der Formel:



Epothilon C $R = H$

4. Epothilon der Summenformel $C_{27}H_{41}NO_5S$, gekennzeichnet durch das 1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1.

5. Epothilon D der Formel:



Epothilon D $R = CH_3$

6. Biotransformant von Epothilon A, dadurch gekennzeichnet, daß man

- (a) *Sorangium cellulosum* DSM 6773 in Gegenwart eines Adsorberharzes in an sich bekannter Weise kultiviert, vom Adsorberharz abtrennt und gegebenenfalls die Gesamtmenge oder einen Teil der abgetrennten Kultur mit einer methanolischen Lösung von Epothilon A versetzt,
- (b) die mit Epothilon A versetzte Kultur inkubiert und danach mit Adsorberharz versetzt,
- (c) das Adsorberharz von der Kultur abtrennt, mit Methanol eluiert und das Eluat zu einem Rohextrakt einengt,
- (d) den Rohextrakt zwischen Ethylacetat und Wasser verteilt, die Ethylacetat-Phase abtrennt und zu einem Öl einengt,
- (e) das Öl an einer Umkehrphase unter folgenden Bedingungen chromatographiert:

Säulenmaterial: Nucleosil 100 C-18 7 μ m
Säulenmaße: 250 x 16 mm
Laufmittel: Methanol/Wasser = 60 : 40
Fluß: 10 ml/min

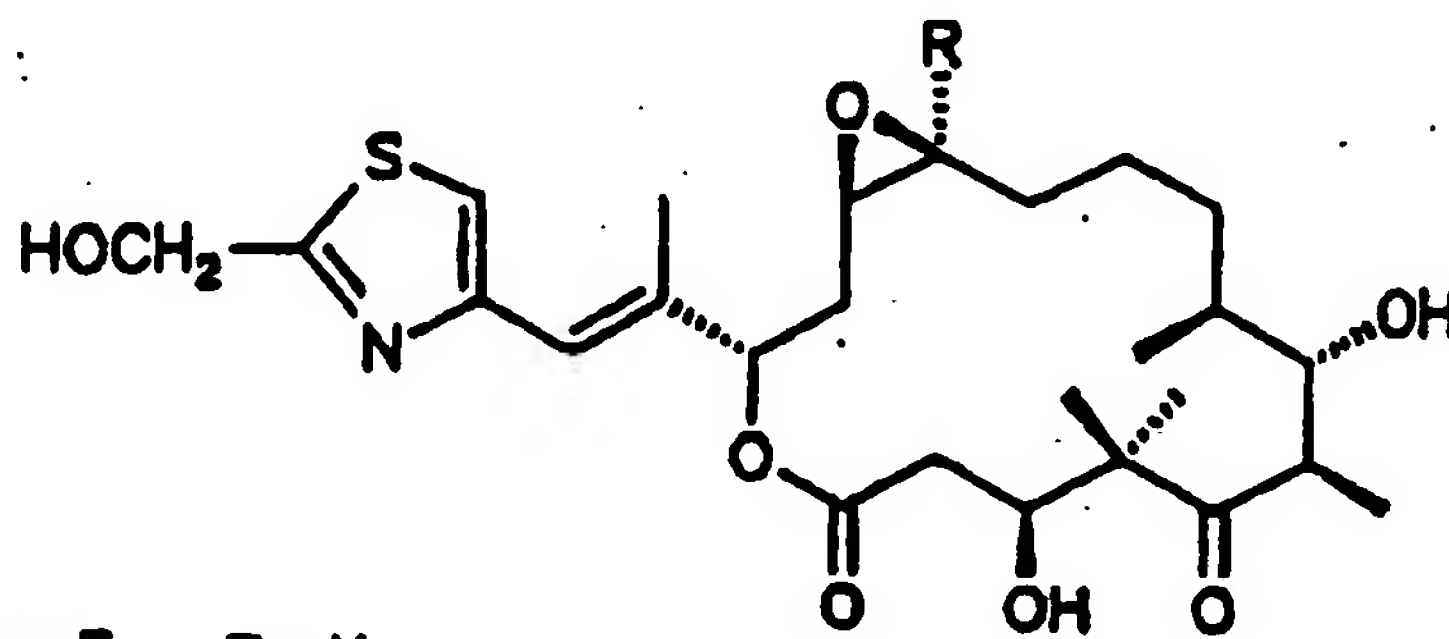
und Fraktionen mit einem Gehalt an Biotransformant, die sich durch UV-Löschung bei 254 nm detektieren lassen, mit einem R_t -Wert von 20 min abtrennt und den Biotransformanten isoliert.

7. Biotransformant von Epothilon A nach Anspruch 6, dadurch gewinnbar, daß man bei Stufe (a) eine Kultur abtrennt, die drei oder vier oder mehr Tage alt ist.

8. Biotransformant von Epothilon A nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gewinnbar, daß man bei Stufe (b) ein oder zwei oder mehr Tage inkubiert.

9. Verbindung der Summenformel $C_{26}H_{39}NO_7S$, gekennzeichnet durch folgendes 1H -NMR-Spektrum (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 2.38 (2- H_a), 2.51 (2- H_b), 4.17 (3-H), 3.19 (6-H), 3.74 (7-H), 1.30 - 1.70 (8-H, 9- H_2 , 10- H_2 , 11- H_2), 2.89 (12-H), 3.00 (13-H), 1.88 (14- H_a), 2.07 (14- H_b), 5.40 (15-H), 6.57 (17-H), 7.08 (19-H), 4.85 (21- H_2), 1.05 (22- H_3), 1.32 (23- H_3), 1.17 (24- H_3), 0.97 (25- H_3), 2.04 (27- H_3)

10. Verbindung (Epothilon E) der Formel:



Epothilon E R = H

11. Biotransformant von Epothilon B, dadurch gewinnbar, daß man

- (a) *Sorangium cellulosum* DSM 6773 in Gegenwart eines Adsorberharzes in an sich bekannter Weise kultiviert, vom Adsorberharz abtrennt und gegebenenfalls die Gesamtmenge oder einen Teil der abgetrennten Kultur mit einer methanolischen Lösung von Epothilon B versetzt,
- (b) die mit Epothilon B versetzte Kultur inkubiert und danach mit Adsorberharz versetzt,
- (c) das Adsorberharz von der Kultur abtrennt, mit Methanol eluiert und das Eluat zu einem Rohextrakt einengt,

- (d) den Rohextrakt zwischen Ethylacetat und Wasser verteilt, die Ethylacetat-Phase abtrennt und zu einem Öl einengt,
- (e) das Öl an einer Umkehrphase unter folgenden Bedingungen chromatographiert:

Säulenmaterial: Nucleosil 100 C-18 7 μ m
Säulenmaße: 250 x 16 mm
Laufmittel: Methanol/Wasser = 60 : 40
Fluß: 10 ml/min

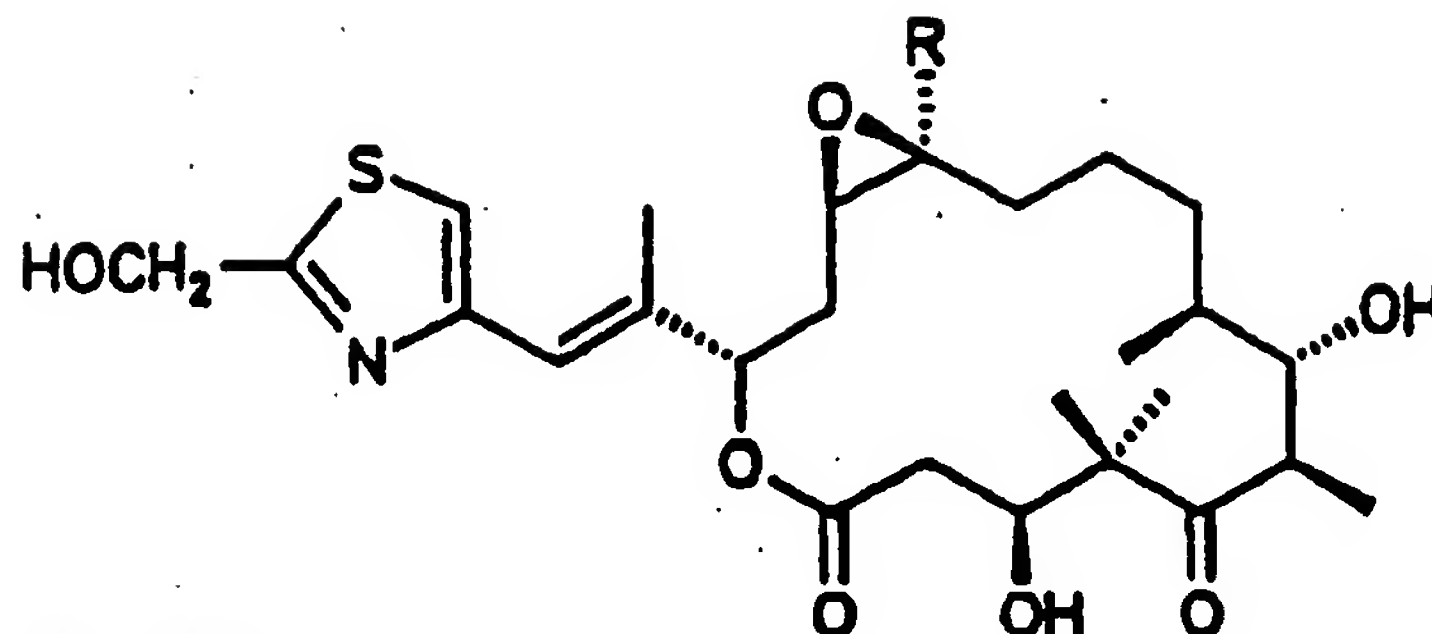
und Fraktionen mit einem Gehalt an Biotransformant, die sich durch UV-Löschung bei 254 nm detektieren lassen, mit einem R_t -Wert von 24,5 min abtrennt und den Biotransformaten isoliert.

12. Biotransformant nach Anspruch 11, dadurch gewinnbar, daß man bei Stufe (a) eine Kultur abtrennt, die drei oder vier oder mehr Tage alt ist.

13. Biotransformant nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gewinnbar, daß man bei Stufe (b) ein oder zwei oder mehr Tage inkubiert.

14. Verbindung der Summenformel $C_{27}H_{41}NO_7S$, gekennzeichnet durch folgendes 1H -NMR-Spektrum (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 2.37 (2- H_a), 2.52 (2- H_b), 4.20 (3-H), 3.27 (6-H), 3.74 (7-H), 1.30 - 1.70 (8-H, 9- H_2 , 10- H_2 , 11- H_2), 2.78 (13-H), 1.91 (14-H), 2.06 (14- H_b), 5.42 (15-H), 6.58 (17-H), 7.10 (19-H), 4.89 (21- H_2), 1.05 (22- H_3), 1.26 (23- H_3), 1.14 (24- H_3), 0.98 (25- H_3), 1.35 (26- H_3), 2.06 (27- H_3)

15. Verbindung (Epothilon F) der Formel:

Epothilon F R = CH₃

16. Mittel für den Pflanzenschutz in der Landwirtschaft und Forstwirtschaft und/oder im Gartenbau, bestehend aus einem oder mehreren der Verbindungen gemäß einem der vorangehenden Ansprüche oder einer oder mehreren dieser Verbindungen neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

17. Therapeutisches Mittel, insbesondere zum Einsatz als Cytostatikum, bestehend aus einer oder mehreren der Verbindungen nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche oder einer oder mehrerer der Verbindungen nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

1 / 3

Fig. 1

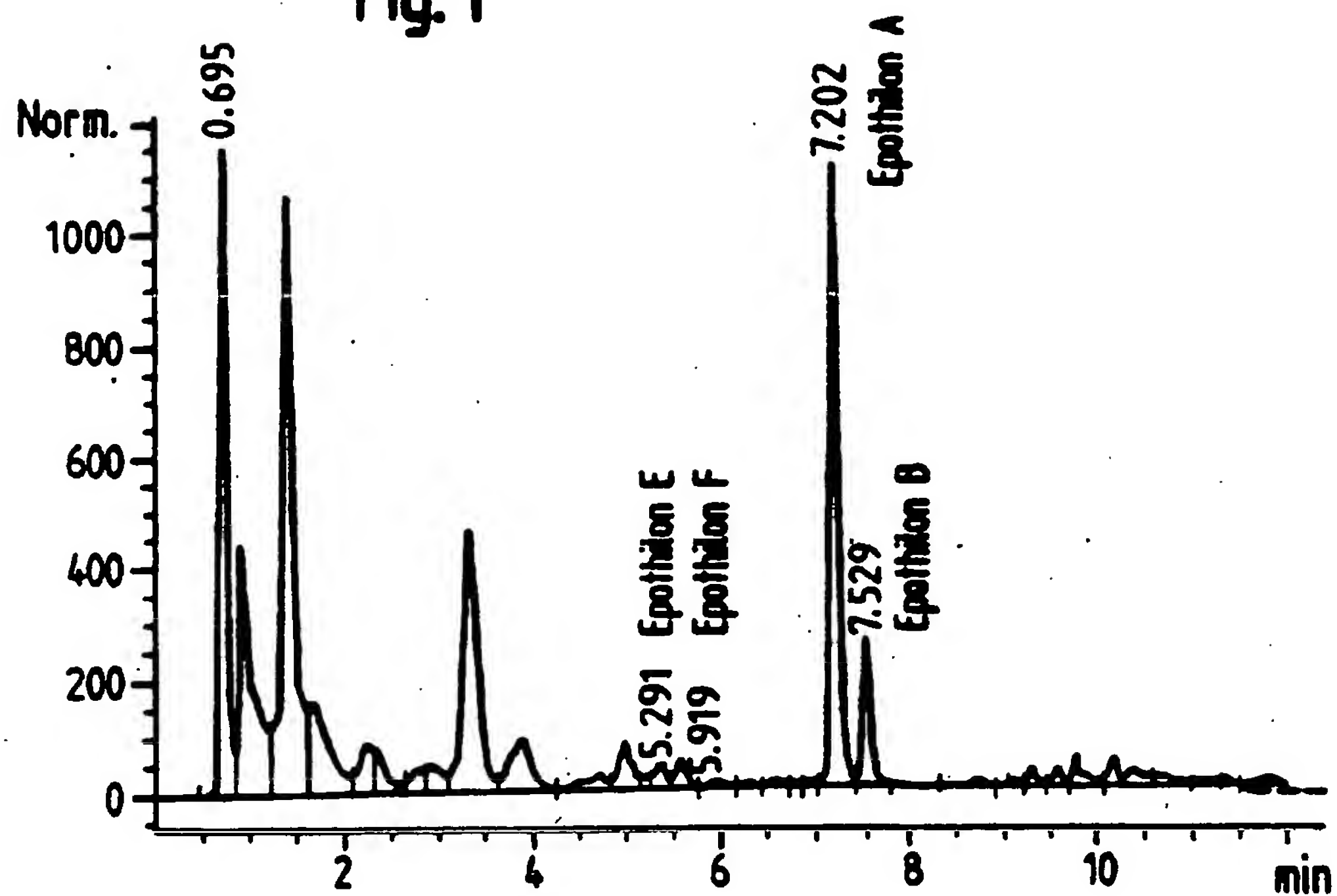
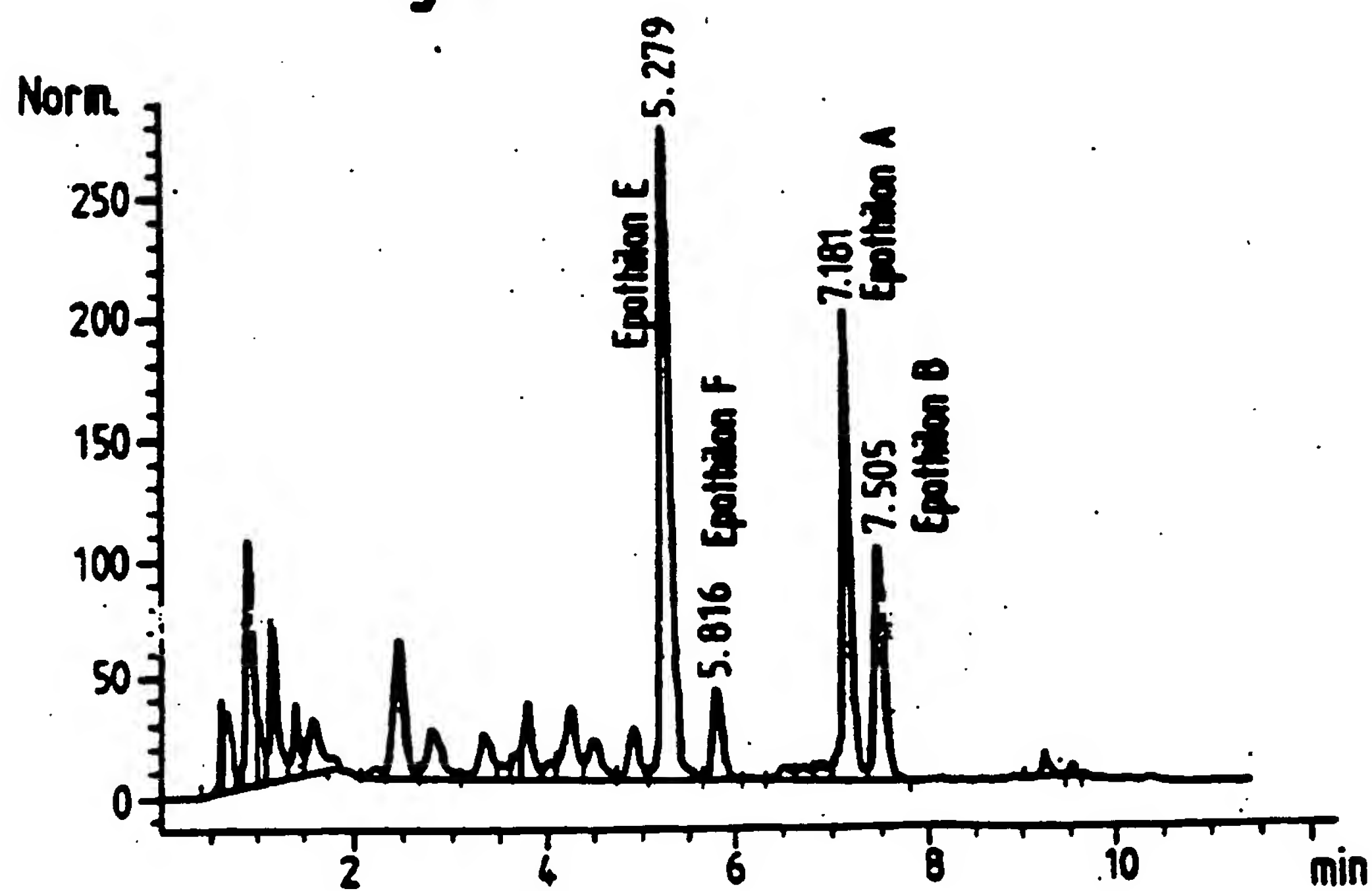


Fig. 2



2 / 3

Fig. 3

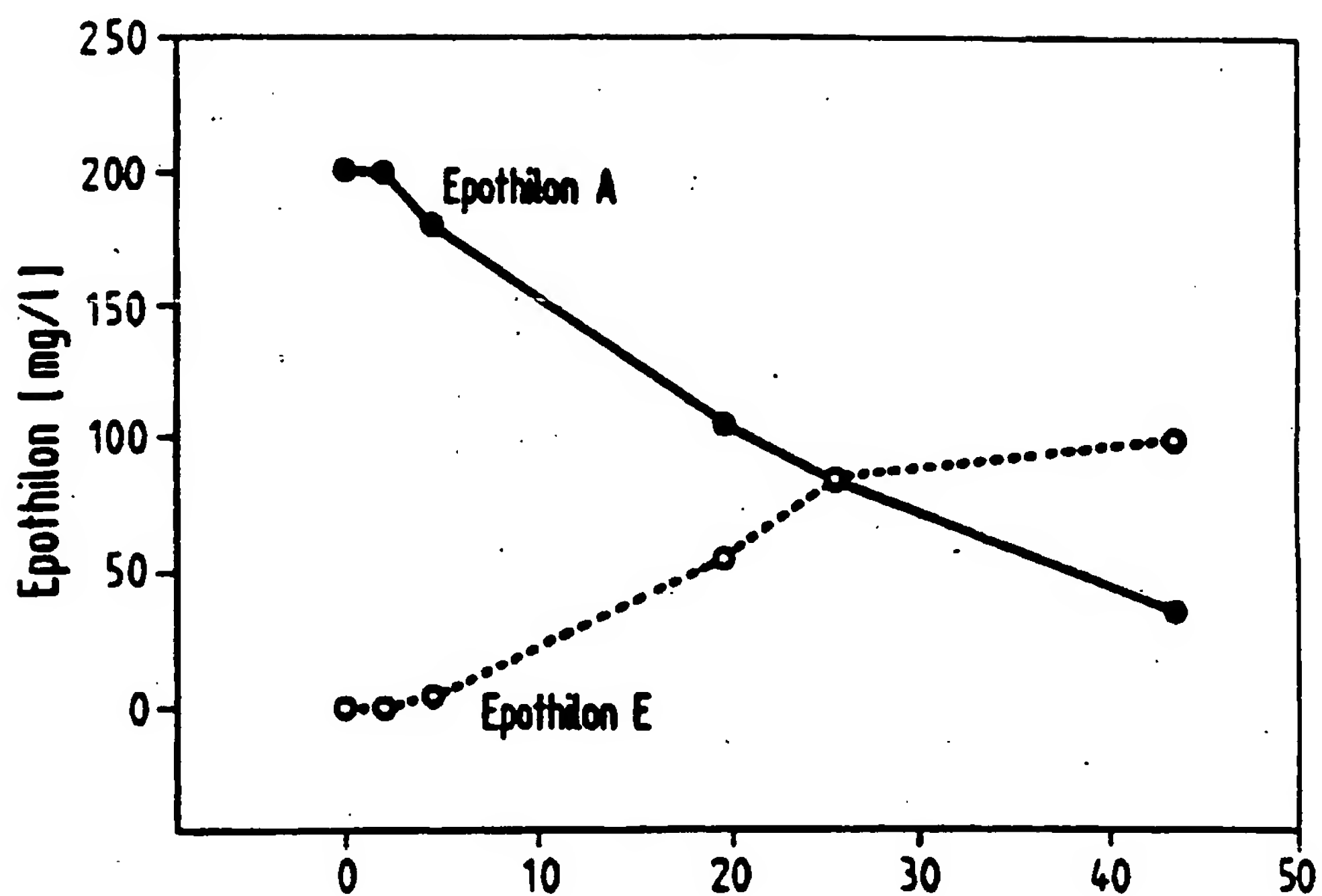
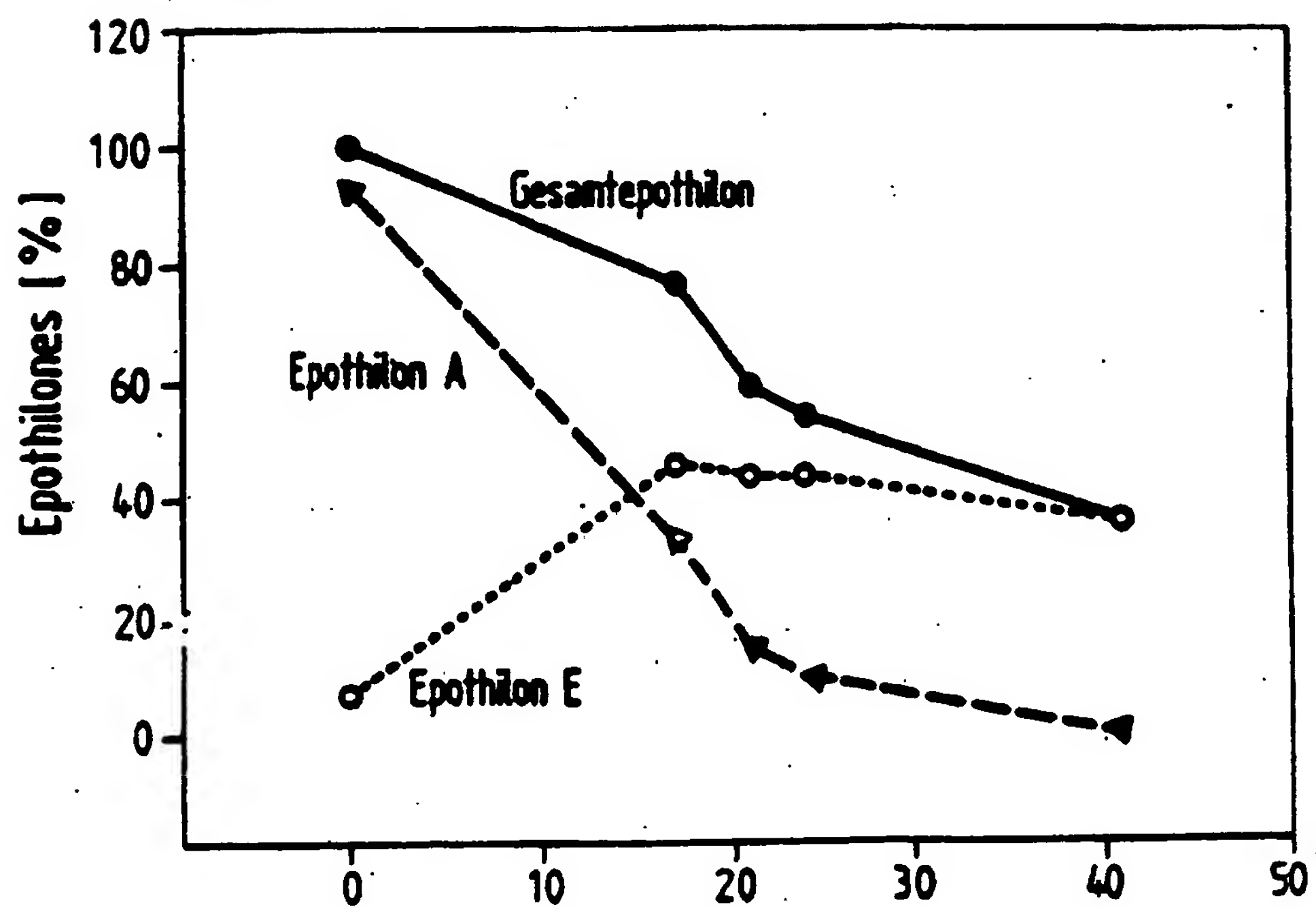
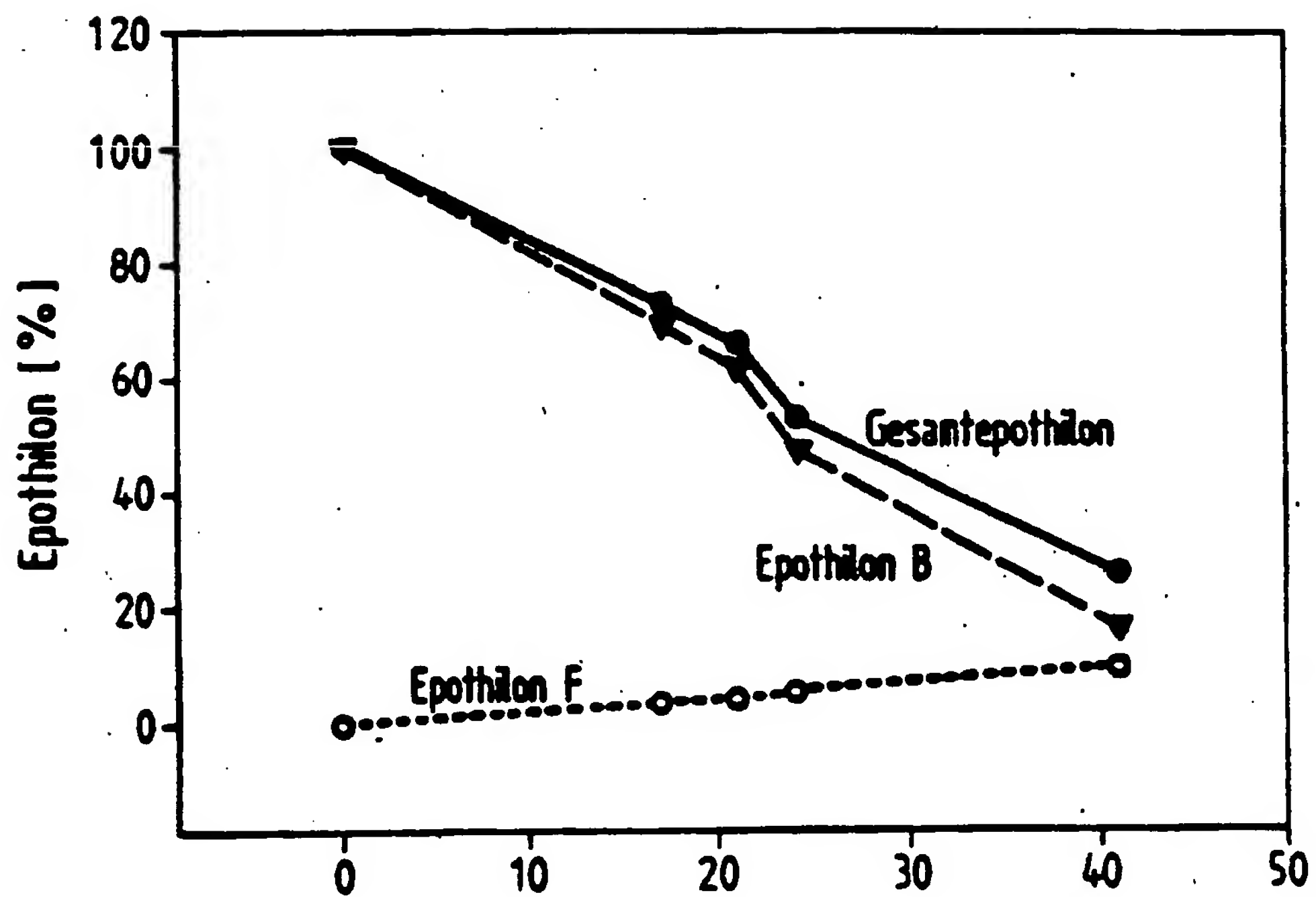


Fig. 4



3 / 3

Fig. 5



1999

1999

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Appl. No.
PCT/EP 97/06442

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07D417/06 C07D493/04 C12P17/08 A01N43/78 A61K31/425
//(C07D493/04,313:00,303:00)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07D

Documentation searched other than minimum documentation in the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 93 10121 A (GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GBF) & CIBA GEIGY AG) 27 May 1993 see claims 1,5-8 & DE 41 38 042 A (GBF) 27 May 1993 cited in the application	1,16,17
P,X	BALOG A. ET AL.: "Total synthesis of (-)-epothilone A" ANGEWANDTE CHEMIE, INTERNATIONAL EDITION IN ENGLISH, vol. 35, no. 23/24, 3 January 1997, pages 2801-2803, XP002035359 see compound 23; page 2803	1-3

☒ Further documents are cited in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categorization of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (to be specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document mentioned in the patent family

Date of the actual completion of the international search

27 March 1998

Date of mailing

6.6.98

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. Box 2910 Paternoster 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2000, Tx. 31 051 ops nl,
Fax: (+31-70) 340-2010

Authorized officer

Hartrampf. G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Appl. No.
PCT/EP 97/06442

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	<p>WD 97 19086 A (GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GBF)) 29 May 1997 cited in the application see page 22 - page 26; claims 12, 13; example 15</p>	1-5, 10, 16, 17
E	<p>--- WD 98 08849 A (NOVARTIS AKTIENGESELLSCHAFT) 5 March 1998 see compounds 19 and 19a, page 32 see claims 2, 9</p>	2-5
A	<p>--- NICOLAOU K.C. ET AL.: "An approach to epothilones based on olefin metathesis" ANGEWANDTE CHEMIE, INTERNATIONAL EDITION IN ENGLISH, vol. 35, no. 20, 4 November 1996, pages 2399-2401. XP002035372</p> <p>-----</p>	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. Appl. No.

PCT/EP 97/06442

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9310121 A	27-05-93	DE 4138042 A	27-05-93
		AU 2943792 A	15-06-93

WO 9719086 A	29-05-97	DE 19542986 A	22-05-97
		DE 19639456 A	26-03-98

WO 9808849 A	05-03-98	DE 19636343 C	23-10-97

1947

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Anhang Patentfälle

PCT/EP 97/06442

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS

IPK 6 C07D417/06 C07D493/04 C12P17/08 A01N43/78 A61K31/425
 //(C07D493/04,313:00,303:00)

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfung (Qualifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07D

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfung gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESSENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 93 10121 A (GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GBF) & CIBA GEIGY AG) 27.Mai 1993 siehe Ansprüche 1,5-8 & DE 41 38 042 A (GBF) 27.Mai 1993 in der Anmeldung erwähnt	1,16,17
P,X	BALOG A. ET AL.: "Total synthesis of (-)-epothilone A" ANGEWANDTE CHEMIE, INTERNATIONAL EDITION IN ENGLISH. Bd. 35, Nr. 23/24, 3.Januar 1997. Seiten 2801-2803, XP002035359 siehe Verbindung 23; Seite 2803	1-3

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Teil C zu entnehmen

☒ Status Anhang Patentfälle

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam angesehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelsfrei anzuerkennen zu lassen, oder durch die die Veröffentlichungsdatum einer anderen in Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (z.B. angeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Beratung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anwendung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindungsbare Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindungsbare Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

2

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

27.März 1998

Abgeschlossen am internationalen Recherchetermin

09.04.98

Name und Postanschrift der internationalen Rechercheinrichtung
 Europäisches Patentamt, P.B. 2018 Patentamt 2
 NL - 2200 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2000, Tx. 31 001 ops nl,
 Fax (+31-70) 340-2010

Bevollmächtigter Beauftragter

Hartrampf, G

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Pat. Anträge

PCT/EP 97/06442

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGEZEIGTE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Bez. Anspruch Nr.
P,X	WO 97 19086 A (GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GBF)) 29.Mai 1997 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 22 - Seite 26; Ansprüche 12,13; Beispiel 15 ---	1-5,10, 16,17
E	WO 98 08849 A (NOVARTIS AKTIENGESELLSCHAFT) 5.März 1998 siehe Verbindungen 19 und 19a, Seite 32 siehe Ansprüche 2,9 ---	2-5
A	NICOLADU K.C. ET AL.: "An approach to epothilones based on olefin metathesis" ANGEWANDTE CHEMIE, INTERNATIONAL EDITION IN ENGLISH, Bd. 35, Nr. 20, 4.November 1996, Seiten 2399-2401, XP002035372 -----	1-17

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern. des Abgrenzungen

PCT/EP 97/06442

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9310121 A	27-05-93	DE 4138042 A	27-05-93
		AU 2943792 A	15-06-93
-----	-----	-----	-----
WO 9719086 A	29-05-97	DE 19542986 A	22-05-97
		DE 19639456 A	26-03-98
-----	-----	-----	-----
WO 9808849 A	05-03-98	DE 19636343 C	23-10-97
-----	-----	-----	-----

Formular PCT/EA/210 (Anhang Patentfamilie) (Juli 1998)

November 17, 1997/he

Our reference: 8824-GBF

New International Patent Application PCT/EP 97/06442

based on DE (1) 96 47 580.5 and DE (1) 97 07 506.1

Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF)

Epothilone C, D, E and F, Preparation and Agents

The present invention is concerned with epothilone C, D, E and F, with their preparation as well as with their application for the preparation of therapeutic agents and agents for plant protection.

Epothilone C and D

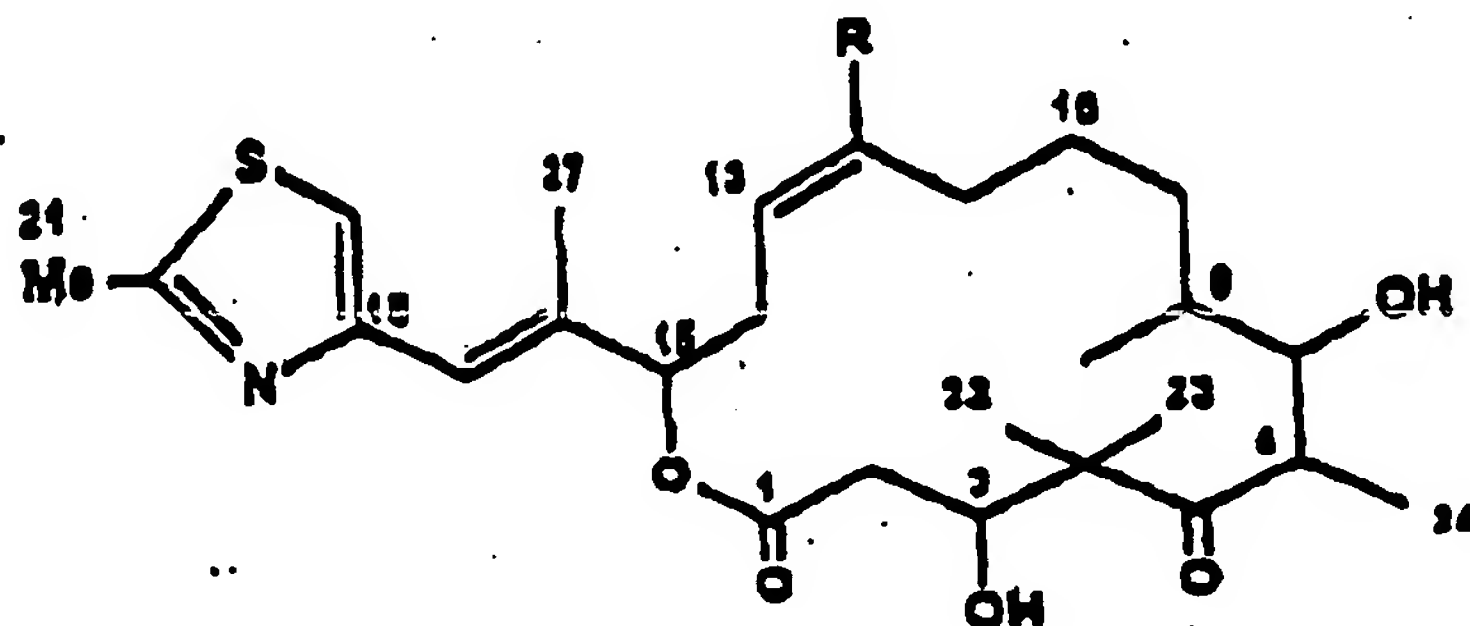
According to an embodiment, the invention is concerned with Epothilone C and D, which can be obtained by

- (a) cultivating *Sorangium cellulosum* DSM 6773 in the presence of an adsorber resin in the known manner,
- (b) the adsorber resin is separated from the culture and is washed with a water/methanol mixture,
- (c) the washed adsorber resin is eluted with methanol and the eluate is evaporated to obtain a crude extract,
- (d) the obtained concentrate is extracted with ethyl acetate, the extract is evaporated and partitioned between methanol and hexane,
- (e) the methanolic phase is evaporated to a raffinate and the concentrate is fractionated on a Sephadex column,
- (f) a fraction is obtained with metabolic products of the microorganism used,
- (g) the obtained fraction is chromatographed on a C18-reverse-phase with a methanol/water mixture and the following are obtained in a time sequence,
 - after a first fraction with epothilone A and
 - a second fraction with epothilone B,
 - a third fraction with first additional epothilone
 - a fourth fraction with a second additional epothilone and
- (h1) the epothilone of the additional fraction and/or

(h2) the epothilone of the second additional fraction is isolated.

Furthermore the invention is concerned with epothilone [C] having the molecular formula $C_{26}H_{39}NO_5S$, characterized by the 1H and ^{13}C -NMR spectrum according to Table 1.

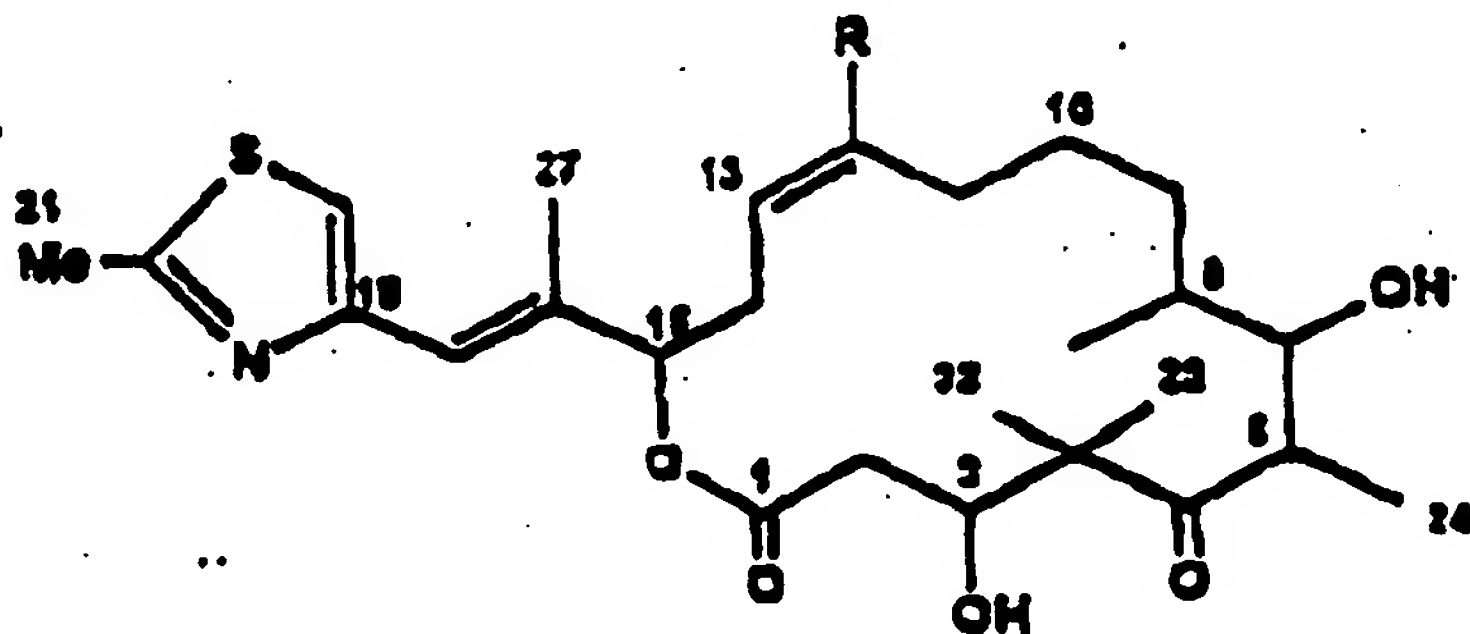
Furthermore, the invention is concerned with epothilone C having the formula:



epothilone C $R = H$

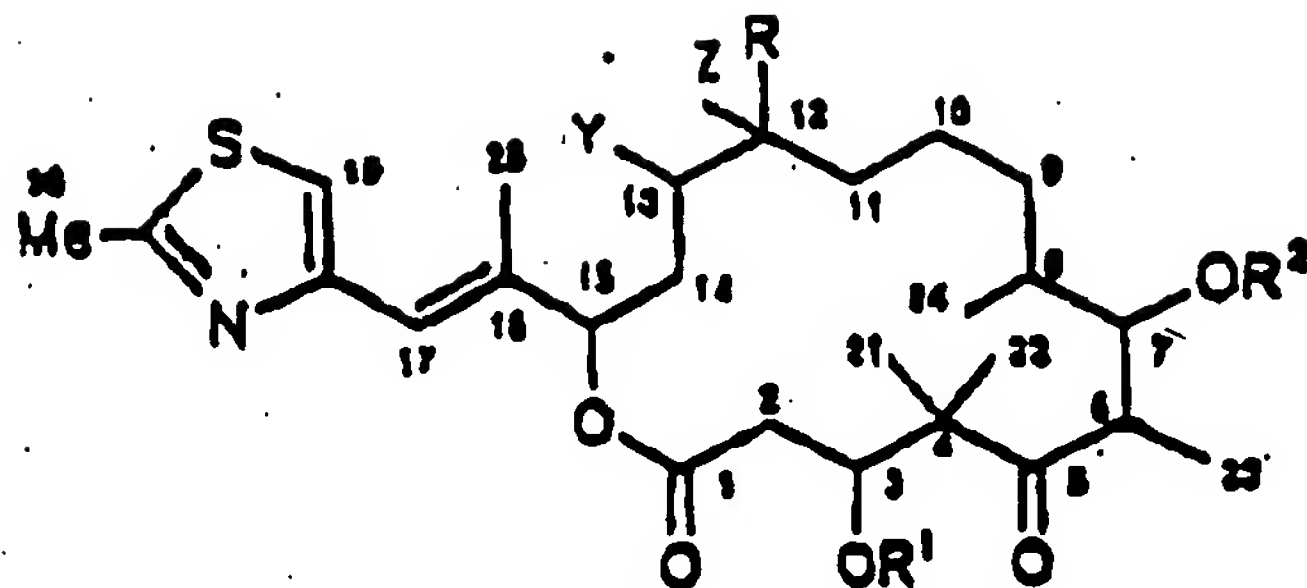
Furthermore, the invention is concerned with epothilone [D] having the molecular formula $C_{27}H_{41}NO_5S$, characterized by the 1H and ^{13}C -NMR spectrum according to Table 1.

Furthermore, the invention is concerned with epothilone D having the formula:



epothilone D $R = CH_3$

Epothilone C and D can be used for the preparation of compounds having the following Formula 1 and, with regard to their derivatization, reference can be made to the derivatization methods described in WO-A-97/19 086.



1

In the above formula 1, the symbols have the following meaning:

$R = H, C_{1-4}$ -alkyl;

$R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 = H, C_{1-6}$ -alkyl,

C_{1-6} acyl benzoyl,

C_{1-4} trialkylsilyl,

benzyl,

phenyl,

C_{1-6} alkoxy-,

C_6 -alkyl, hydroxy and halogen-substituted benzyl or phenyl;

but two of the groups R^1 to R^5 can be combined to form the group $-(CH_2)_n-$ with $n = 1$ to 6, and the alkyl and acyl groups contained in these groups are straight-chain or branched groups;

Y and Z are either the same or different and each stands for hydrogen, halogen, such as F, Cl, Br or I, pseudohalogen, such as $-NCO$, $-NCS$ or $-N_3$, OH, $O-(C_{1-4})$ -acyl, $O-(C_{1-4})$ -alkyl, O -benzoyl, Y and Z can also be the O-atom of an epoxide, but epothilone A and B are not claimed, or one of the C-C bonds can be a C=C double bond.

Thus, the 12,13-double bond can be selectively

- hydrogenated, for example, catalytically or with diimine, obtaining a compound having formula 1 with $Y = Z = H$; or

- epoxidized, for example, with dimethyldioxirane or a peracid, obtaining a compound having Formula 1 with Y with $Z = -O-$; or

- converted to the dihalides, dipseudohalides or diazides, obtaining a compound having formula 1 with Y and $Z =$ halogen, pseudohalogen or N_3 .

Epothilone E and F

According to another embodiment, the invention is concerned with a biotransformant of epothilone A, which can be obtained by:

- (a) cultivating *Sorangium cellulosum* DSM 6773 in the presence of an adsorber resin in the known manner, separating it from the adsorber resin and optionally adding a methanolic solution of epothilone A to the total amount or to a part of the separated culture,
- (b) the culture to which the epothilone A was added is incubated and then adsorber resin is added,
- (c) the adsorber resin is separated from the culture, eluted with methanol and the eluate is evaporated to a crude extract,
- (d) the crude extract is partitioned between ethyl acetate and water, the ethyl acetate phase is separated and evaporated to an oil,
- (e) the oil is chromatographed on a reverse phase under the following conditions:
 - column material: Nucleosil 100 C-18 7 μ m
 - column dimensions: 250 x 16 mm
 - solvent: methanol/water = 60:40
 - flow rate: 10 mL/min

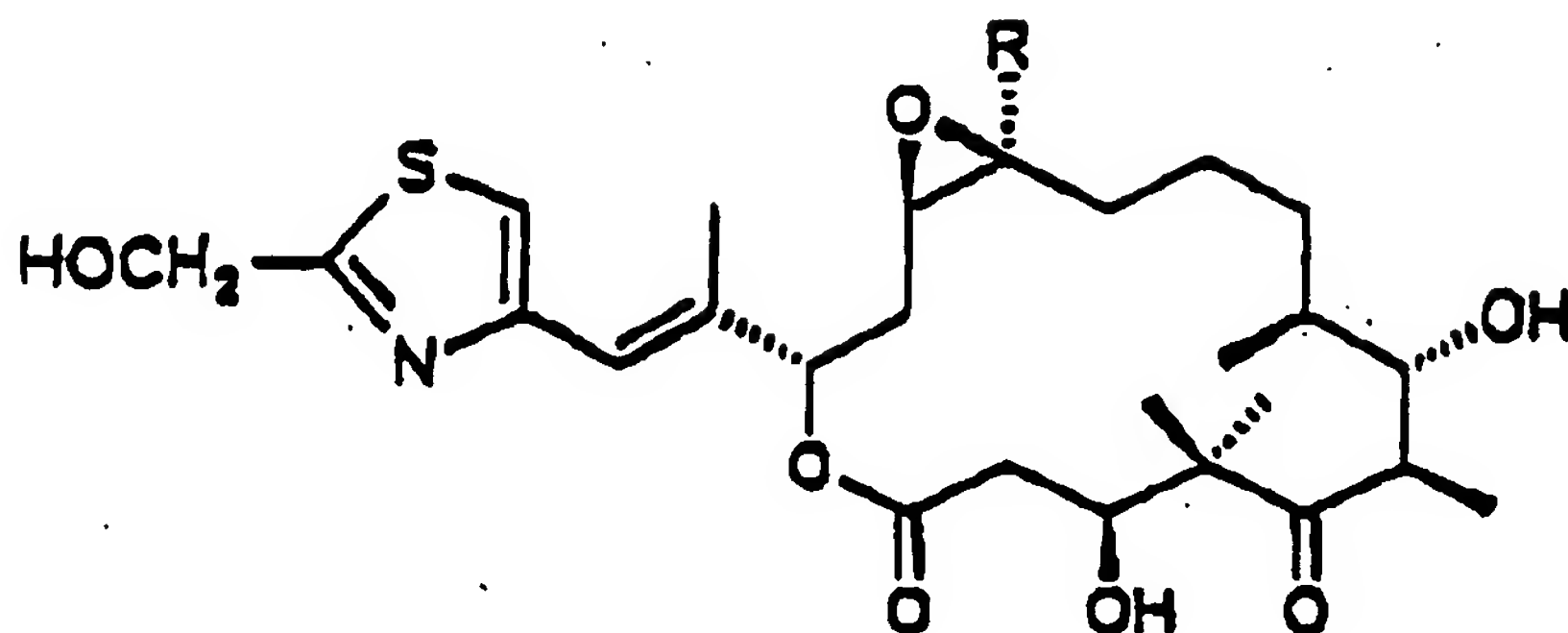
and fractions with a content of biotransformant, which can be detected by UV adsorption at 254 nm, with an R_f value of 20 minutes, is separated and the biotransformant is isolated.

Furthermore, the invention is concerned with such a biotransformant of epothilone A, which can be obtained by separating a culture in step (a), which is three or four days old or more.

Furthermore, the invention is concerned with such a biotransformant of epothilone A, which can be obtained by incubating step (b) one or two or more days.

Furthermore, the invention is concerned with a compound having the molecular formula $C_{26}H_{39}NO_7S$, characterized by the following 1H -NMR spectrum (300 MHz, $CDCl_3$):

Furthermore, the invention is concerned with a compound (epothilone E) having the following formula:



epothilone E R = H

According to a further embodiment, the invention is concerned with a biotransformant of epothilone B, which can be obtained by

- (a) cultivating *Sorangium cellulosum* DSM 6773 in the presence of an adsorber resin in the known manner, separating it from the adsorber resin and optionally the total amount or a part of the separated culture is treated with a methanolic solution of epothilone B,
- (b) the culture to which the epothilone B was added is incubated and then adsorber resin is added,
- (c) the adsorber resin is separated from the culture, eluted with methanol and the eluate is evaporated to give a crude extract,
- (d) the crude extract is partitioned between ethyl acetate and water, the ethyl acetate phase is separated and evaporated to an oil,
- (e) the oil is chromatographed on a reverse-phase under the following conditions:
column material: Nucleosil 100 C-18 7 μ m
column dimensions: 250 x 16 mm
solvent: methanol/water = 60:40
flow rate: 10 mL/min

and fractions with a biotransformant content that can be detected by UV absorption at 254 nm, with an R_f value of 24.5 min are separated and the biotransformant isolated.

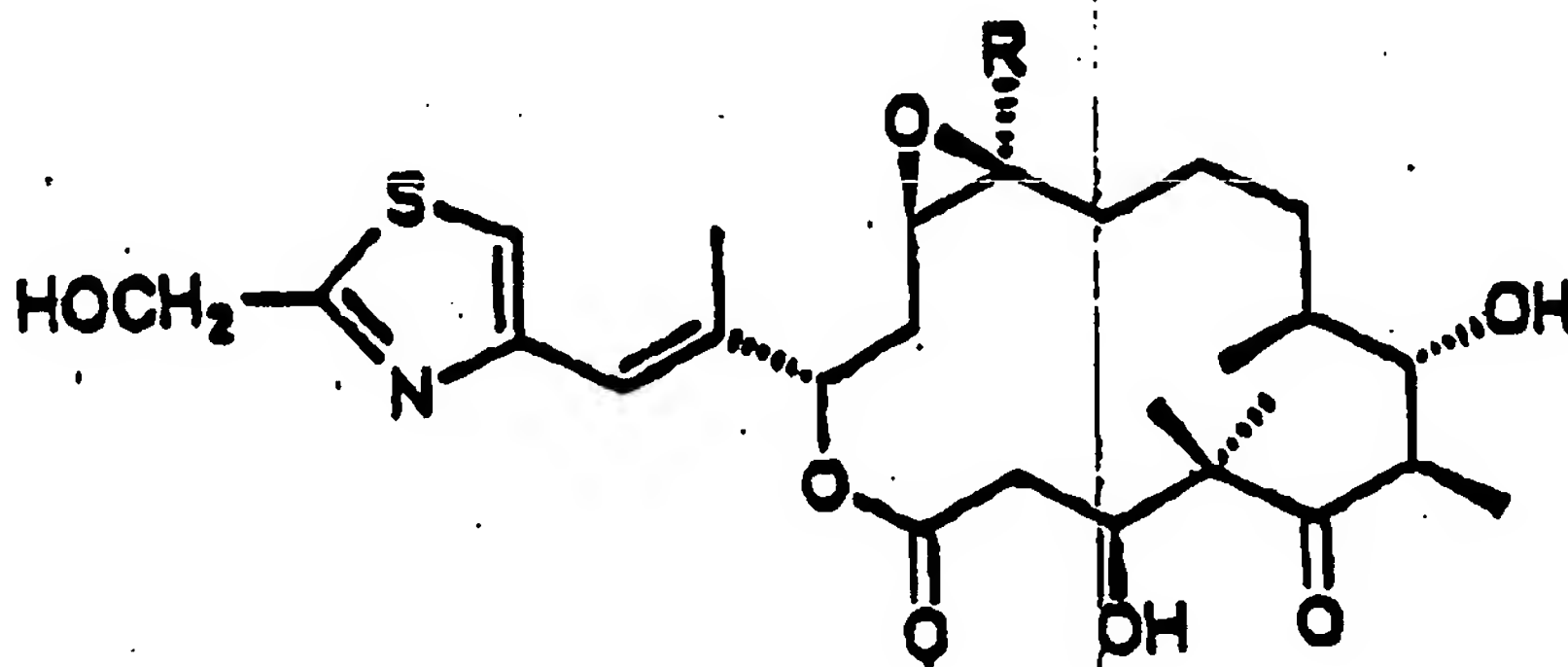
Furthermore, the invention is concerned with such a biotransformant of epothilone B, which can be obtained by separating at step (a) a culture which is three or four or more days old.

Furthermore, the invention is concerned with such a biotransformant of epothilone B, which can be obtained by incubation at step (b) for one or two or more days.

Furthermore, the invention is concerned with a compound having the molecular formula $C_{27}H_{41}NO_7S$, characterized by the following 1H -NMR spectrum (300 MHz, $CDCl_3$):

δ = 2.37 (2- H_a), 2.52 (2- H_b), 4.20 (3-H), 3.27 (6-H), 3.74 (7-H), 1.30 - 1.70 (8-H, 9- H_2 , 10- H_2 , 11- H_2), 2.78 (13-H), 1.91 (14-H), 2.06 (14- H_b), 5.42 (15-H), 6.58 (17-H), 7.10 (19-H), 4.89 (21- H_2), 1.05 (22- H_3), 1.26 (23- H_3), 1.14 (24- H_3), 0.98 (25- H_3), 1.35 (26- H_3), 2.06 (27- H_3).

Furthermore, the invention is concerned with a compound (epothilone F) having the formula:



epothilone F $R = CH_3$

Preparation and means

The compounds according to the invention or epothilones can be obtained with the measures listed above.

Furthermore, the invention is concerned with means for plant protection in agriculture, forestry and/or gardening, consisting of one or more of epothilones C, D, E and F listed above or consisting of one or several of the epothilones listed above in addition to one or several usual carrier(s) and/or diluent(s).

Finally, the invention is concerned with therapeutic agents consisting of one or more of the compounds listed above or one or more of the compounds listed above together with one or more of common carrier(s) and/or diluent(s). These means can exhibit especially cytotoxic activities and/or cause immune suppression and/or can be used for the combatting of malignant tumors, where they are used especially preferably as cytostatic agents.

The invention is explained in more detail and described below by the description of some selected practical examples.

Examples

Example 1

Epothilone C and D

A. Product strain and culture conditions corresponding to epothilone basic patent DE-B-41 38 042

B. Production with DSM 6773

75 L of culture is raised as described in the basic patent and used for inoculating a production fermenter with 700 L production medium consisting of 0.8% starch, 0.2% glucose, 0.2% soy meal, 0.2% yeast extract, 0.1% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8 mg/L of Fe-EDTA, pH = 7.4 and optionally 15 L of adsorber resin Amberlite XAD-16. The fermentation takes 7-10 days at 30°C, with aeration at 0.1 NL/m³. The pO₂ is kept at 30% by adjusting the rate of rotation.

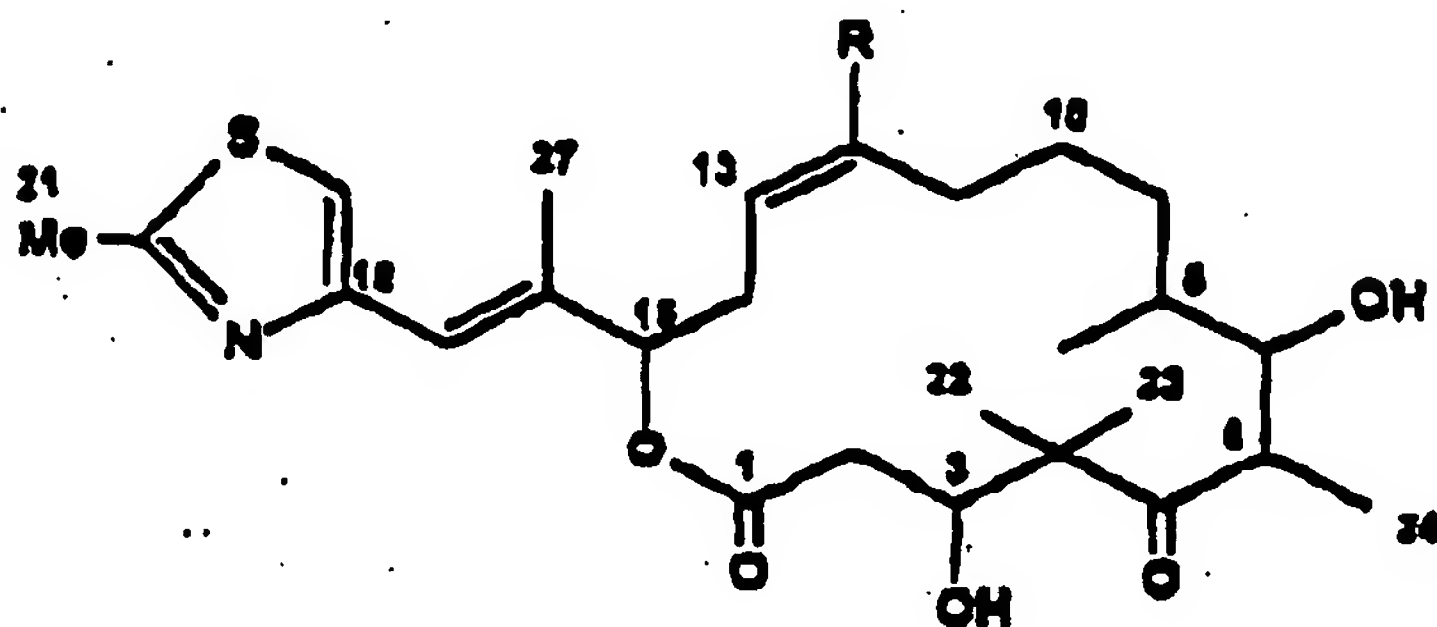
C. Isolation

The adsorber resin is separated from the culture with a 0.7 m², 100 mesh process filter and the polar accompanying substances are removed by washing with 3 bed volumes of water/methanol 2:1. A crude extract is obtained by elution with 4 bed volumes of methanol. This is evaporated in vacuum until the appearance of the aqueous phase.

This is then extracted three times with the same volume of ethyl acetate. Evaporation of the organic phase gives 240 g of crude extract, which is partitioned between methanol and heptane in order to separate lipophilic accompanying substances. Then 180 g of raffinate is obtained from the methanol phase by evaporation in vacuum. This is fractionated into three

portions on Sephadex LH-20 (column 20 x 100 cm, 20 mL/min of methanol). The epothilones are contained in the fraction eluted at a retention time of 240-300 min in a total amount of 72 g. To separate the epothilones, the product is chromatographed in three portions on Lichrosorb RP-18 (15 μ m, column 10 x 40 cm, solvent 180 mL/min methanol/water 65:35). After the epothilone A and B, epothilone C and epothilone D are eluted at R_f = 90-95 min and 100-110 min, respectively. After evaporation in vacuum, each is obtained in a yield of 0.3 g as colorless oils.

D. Physical properties



epothilone C $R = H$
 epothilone D $R = CH_3$

Epothilone C

$C_{26}H_{39}NO_5S$ [477]

ESI-MS: (positive ions): 478.5 for $[M+H]^+$

1H and ^{13}C see NMR Table.

TLC: $R_f = 0.82$

TLC: aluminum foil 60 F 254 Merck, solvent: dichloromethane/methanol = 9:1

Detection: UV absorption at 254 nm. Spraying with vanillin-sulfuric acid reagent, blue-gray coloration upon heating to 120°C.

HPLC: $R_f = 11.5$ min

Column: Nucleosil 100 C-18, 7 μ m, 125 x 4 mm

Solvent: methanol/water = 65:35

Flow rate: 1 mL/min

Detection: diode array

Epothilone D

$C_{27}H_{41}NO_5S$ [491]

ESI-MS: (positive ions): 492.5 for $[M+H]^+$

1H and ^{13}C , see NMR Table

TLC: $R_f = 0.82$

TLC: aluminum foil 60 F 254 Merck, solvent: dichloromethane/methanol = 9:1

Detection: UV absorption at 254 nm. Spraying with vanillin-sulfuric acid reagent, blue-gray coloration upon heating to 120°C.

HPLC: $R_t = 15.3$ min

Column: Nucleosil 100 C-18 7 μm , 125 x 4 mm

Solvent: methanol/water = 65:35

Flow rate: 1 mL/min

Detection: diode array

Table 1: ^1H and ^{13}C -NMR data of epothilone C and epothilone D in $[\text{D}_6]$ DMSO at 300 MHz

Epothilone C				Epothilone D			
H-Atom	δ (ppm)	C-Atom	δ (ppm)	δ (ppm)	C-Atom	δ (ppm)	
		1	170.3		1	170.1	
2-Ha	2.38	2	38.4	2.35	2	39.0	
2-Hb	2.50	3	71.2	2.38	3	70.8	
3-H	3.97	4	53.1	4.10	4	53.2	
3-OH	5.12	5	217.1	5.08	5	217.4	
6-H	3.07	6	45.4	3.11	6	44.4	
7-H	3.49	7	75.9	3.48	7	75.5	
7-OH	4.46	8	35.4	4.46	8	36.3	
8-H	1.34	9	27.6	1.29	9	29.9	
9-Ha	1.15	10	30.0	1.14	10	25.9	
9-Hb	1.40	11	27.6	1.38	11	31.8*	
10-Ha	1.15*	12	124.6	1.14*	12	138.3	
10-Hb	1.35*	13	133.1	1.35*	13	120.3	
11-Ha	1.90	14	31.1	1.75	14	31.6*	
11-Hb	2.18	15	76.3	2.10	15	76.6	
12-H	5.38**	16	137.3		16	137.2	
13-H	5.44**	17	119.1	5.08	17	119.2	
14-Ha	2.35	18	152.1	2.30	18	152.1	
14-Hb	2.70	19	117.7	2.65	19	117.7	
15-H	5.27	20	164.2	5.29	20	164.3	
17-H	6.50	21	18.8	6.51	21	18.9	
19-H	7.35	22	20.8	7.35	22	19.7	
21-H ₂	2.65	23	22.6	2.65	23	22.5	
22-H ₂	0.94	24	16.7	0.90	24	16.4	
23-H ₂	1.21	25	18.4	1.19	25	18.4	
24-H ₂	1.06	27	14.2	1.07	26	22.9	
25-H ₂	0.90			0.91	27	14.1	
26-H ₂				1.63			
27-H ₂	2.10			2.11			

*, ** Assignment interchangeable

Example 2:

Epothilone A and 12,13-bisepi-epothilone A from epothilone C

Epothilone A, 50 mg, is dissolved in 1.5 mL acetone and 1.5 mL of a 0.07 molar solution of dimethyldioxiran 2. The mixture is stirred. After standing for 6 hours at room temperature, the

mixture is evaporated in vacuum and separated by preparative HPLC on silica gel (solvent: methyl-tert.-butyl ether/petroleum ether/methanol 33:66:1).

Yield:

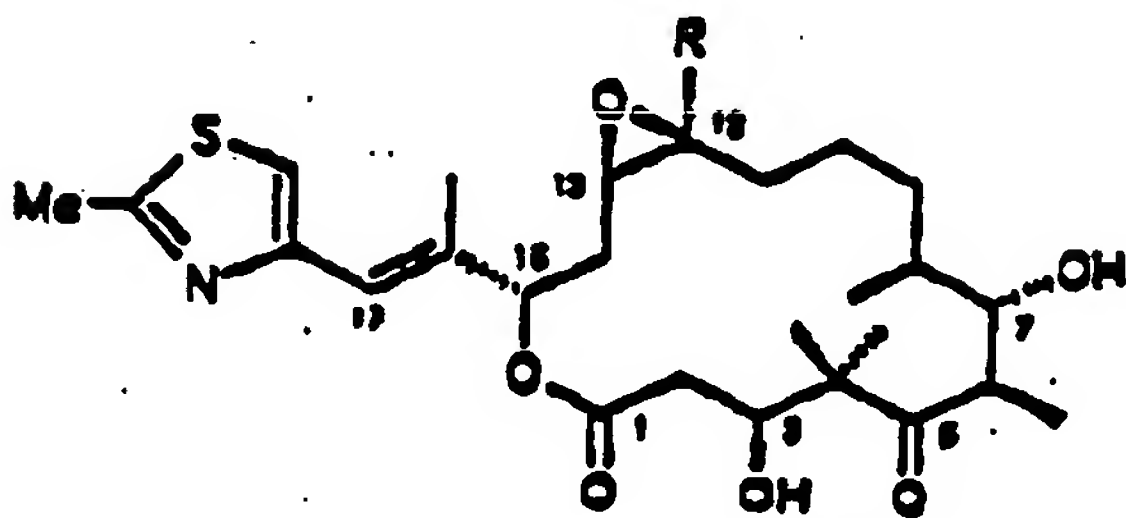
25 mg of epothilone A, $R_f = 3.5$ min (analytical HPLC, 7 μ m, column 4 x 250 mm, solvent see above, flow rate 1.5 mL/min)

and

20 mg of 12,13-bisepi-epothilone A, $R_f = 3.7$ min, ESI-MS (positive ions)

$m/z = 494 [M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$ in $[\text{D}_4]$ methanol, selected signals: $\delta = 4.32$ (3-H), 3.79 (7-H), 3.06 (12-H), 3.16 (13-H), 5.54 (15-H), 6.69 (17-H), 1.20 (22-H), 1.45 (23-H).



12,13-bisepi-epothilone A

$R = \text{H}$

Example 3:

Epothilone E and F, new biotransformation products of epothilones A and B

Production strain:

The production strain, *Sorangium cellulosum* So ce90, was isolated from a soil sample collected in July 1985 at the GBF at the banks of the Zambesi and was deposited on 10/28/91 in the Deutsche Sammlung für Mikroorganismen [German Collection for Microorganisms] under No. DSM 6772.

The characterization of the producing organism as well as the culturing conditions are described in:

Höfle, G.; N. Bedorf, K. Gerth & H. Reichenbach: Epothilones, their methods of preparation as well as agents containing them. DE 41 38 042 A1, laid open on May 27, 1993.

Formation of epothilones E and F during fermentation: [probably should be epothilones A and E - Translator]

A typical fermentation runs as follows: a 100 L bioreactor is filled with 60 L medium (0.8% starch; 0.2% glucose; 0.2% soy meal; 0.2% yeast extract; 0.1% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0.1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 8 mg/L of Fe-EDTA; pH 7.4). In addition, 2% adsorber resin (XAD-16, Rohm & Haas) was added. The medium is sterilized by autoclaving (2 hours, 120°C). Inoculation is done with 10 L of a preculture raised in a shaking flask in the same medium (in addition: 50 mM HEPES buffer pH 7.4) (160 rpm, 30°C). The fermentation is carried out at 32°C at a stirrer velocity of 500 rpm and aeration with 0.2 NL per m^3 and hour. The pH value is kept at 7.4 by the addition of KOH. The fermentation takes 7 to 10 days. The formed epothilones are bound to the adsorber resin continuously during the fermentation. After separation of the culture broth (for example, by sieving in a process filter) the resin is washed with 3 bed volumes of water and eluted with 4 bed volumes of methanol. The eluate is evaporated to dryness and is taken up in 700 mL of methanol.

HPLC analysis of the XAD eluate:

With respect to the initial volume of the reactor (70 L), the eluate is concentrated 100:1. The analysis is carried out with an HPLC unit 1090 made by Hewlett Packard. A Microbore column (125/2 Nucleosil 120-5 C_{18}) made by Machery-Nagel (Düren) is used for separating the components. The elution is done with a water/acetonitrile gradient from initially 75:25 to 50:50 after 5.5 minutes. This ratio is then maintained till the 7th minute and then increased to 100% acetonitrile up to the 10th minute.

The measurement is carried out at a wavelength of 250 nm and with a band width of 4 nm. The diode array spectra are measured in the wavelength region from 200 to 400 nm. In the XAD eluate, two new substances are noticed with R_f of 5.29 and R_f of 5.91; the adsorption spectra of these are identical to those of epothilones A and B, respectively (Figure 1; e corresponds to A, F corresponds to B). These substances are formed only in traces under the given fermentation conditions.

Biotransformation of epothilone A and B to epothilone E and F:

For the directed biotransformation, a 4-day old culture of So ce90, 500 mL, is used, kept with adsorber resin. Of this, 250 mL is introduced into a sterile 1 L Erlenmeyer flask leaving the XAD behind. After that, a methanolic solution of a mixture of a total of 36 mg of epothilone A and 14 mg of epothilone B is added and the flask is incubated for two days at 30°C and 200 rpm on a shaking chest [literal]. The formation of epothilone E and F is analyzed directly on 10 µL of the centrifuged culture supernatant (Figure 2). The conversion occurs only in the presence of the cells and is dependent on the cell density used and on the time. The kinetics of conversion for epothilone A is shown in Figure 3.

Isolation of epothilone E and F

To isolate epothilone E and F, the shaking flask batches from the biotransformation (see above) are combined and are shaken for 1 hour with 20 mL of XAD-16. The XAD is recovered by sieving and is eluted with 200 mL of methanol. The eluate is evaporated in vacuum to 1.7 g crude extract. This is then partitioned between 30 mL of ethyl acetate and 100 mL of water. Upon evaporation in vacuum, 330 mg of an oily residue is obtained from the ethyl acetate phase. This is chromatographed in five runs through a 250 x 20 mm RP-18 column (solvent: methanol/water 58:42, detection 254 nm).

Yield:	Epothilone E	50 mg
	F	10 mg

Biological effect of epothilone E:

Using cell cultures, the concentration which reduces growth by 50% (IC₅₀) was determined, and the results were compared with the values for epothilone A.

<u>cell line</u>	<u>IC₅₀ (ng/mL)</u>	
	<u>epothilone E</u>	<u>epothilone A</u>
HeLa. KB-3.1 (human)	5	1
mouse fibroblasts, L929	20	4

Epothilone E

$C_{26}H_{39}HO_7S$ [509]

ESI-MS: (positive ions): 510.3 for $[M+H]^+$

TLC: $R_f = 0.58$

TLC: aluminum foil 60 F 254 Merck. Solvent: dichloromethane/methanol = 9:1

Detection: UV absorption at 254 nm. Spraying with vanillin-sulfuric acid reagent; blue-gray coloration upon heating to 120°C

HPLC: $R_t = 5.0$ min

Column: Nucleosil 100 C-18 7 μm , 250 x 4 mm

Solvent: methanol/water = 60:40

Flow rate: 1.2 mL/min

Detection: diode array

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 2.38 (2- H_a), 2.51 (2- H_b), 4.17 (3- H), 3.19 (6- H), 3.74 (7- H), 1.30 - 1.70 (8- H , 9- H_2 , 10- H_2 , 11- H_2), 2.89 (12- H), 3.00 (13- H), 1.88 (14- H_a), 2.07 (14- H_b), 5.40 (15- H), 6.57 (17- H), 7.08 (19- H), 4.85 (21- H_2), 1.05 (22- H_3), 1.32 (23- H_3), 1.17 (24- H_3), 0.97 (25- H_3), 2.06 (27- H_3)

Epothilone F

$C_{27}H_{41}NO_7S$ [523]

ESI-MS: (positive ions): 524.5 for $[M+H]^+$

TLC: $R_f = 0.58$

TLC: aluminum foil 60 F 254 Merck. Solvent: dichloromethane/methanol = 9:1

Detection: UV absorption at 254 nm. Spraying with vanillin-sulfuric acid reagent; blue-gray coloration upon heating to 120°C

HPLC: $R_t = 5.4$ min

Column: Nucleosil 100 C-18 7 μm , 250 x 4 mm

Solvent: methanol/water = 60:40

Flow rate: 1.2 mL/min

Detection: diode array

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz , CDCl_3): δ = 2.37 (2- H_a), 2.52 (2- H_b), 4.20 (3- H), 3.27 (6- H), 3.74 (7- H), 1.30 - 1.70 (8- H , 9- H_2 , 10- H_2 , 11- H_2), 2.78 (13- H), 1.91 (14- H), 2.06 (14- H_b), 5.42 (15- H), 6.58 (17- H), 7.10 (19- H), 4.89 (21- H_2), 1.05 (22- H_3), 1.26 (23- H_3), 1.14 (24- H_3), 0.98 (25- H_3), 1.35 (26- H_3), 2.06 (27- H_3).

Example 4:

Preparation of epothilone E and F by biotransformation with *Sorangium cellulosum* So ce90

1) Carrying out the biotransformation

A culture of *Sorangium cellulosum* So ce90, which was shaken for four days in the presence of 2% XAD 16 adsorber resin (Rohm und Haas, Frankfurt/M.) at 30°C and 160 rpm, was used for the biotransformation. The culture medium has the following composition in g/liter of distilled water: potato starch (Maizena), 8; glucose (Maizena) 8; defatted soy meal, 2; yeast extract (marcor), 2; ethylenediaminetetraacetic acid, iron(III) sodium salt, 0.008; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1; HEPES 11.5. The pH value is adjusted to 7.4 with KOH before autoclaving. The XAD is separated from the culture by sieving through a stainless steel screen (mesh size 200 μm). The bacteria are sedimented by centrifuging for 10 minutes at 10,000 rpm and the pellet was resuspended in 1/5 of the culture supernatant. Now, epothilone A or epothilone B in methanolic solution is added to the concentrated bacterial suspension at a concentration of 0.5 g/L. The culture is cultured further as described above. For the analysis of biotransformation, at the desired times, a 1 mL sample is taken, to which 0.1 mL of XAD is added and then the sample is shaken for 30 minutes at 30°C. The XAD is eluted with methanol. The eluate is evaporated to dryness and taken up again in 0.2 mL of methanol. This sample was analyzed by HPLC.

Figure 4) Kinetics of the biotransformation of epothilone A to epothilone E

Figure 5) Kinetics of the biotransformation of epothilone B to epothilone F

2) Preparation of epothilone E by biotransformation of 1 g of epothilone A

The strain *Sorangium cellulosum* So ce90 is cultured for four days in 8.5 L of the above medium (but without the addition of XAD) in a 10 liter bioreactor at 30°C at a rate of rotation of 150 rpm and with aeration of 0.1 vvm.

Then the culture is concentrated to 3 L by cross flow filtration. A membrane with a pore size of 0.3 μm and an area of 0.6 m^2 was used for this purpose.

The concentrated culture is transferred into a 4 liter bioreactor and a methanolic solution of 1 g of epothilone A in 10 mL of methanol is added. Then the culture is cultured further over a period of 21.5 h. The temperature is 32°C, the stirrer rotation rate 455 rpm and the aeration is done at a rate of 6 L/min. At the time of harvesting, 100 mL of XAD is added and the mixture is incubated further for 1 hour. The XAD is separated from the cells with a screen and then eluted exhaustively with methanol. The concentrated eluate is analyzed by HPLC.

Balancing of the biotransformation:

epothilone A used:	1000 mg = 100%
epothilone A found after 21.5 h:	53.7 mg = 5.4%
epothilone E formed after 21.5 h:	661.4 mg = 66.1%
epothilone A completely degraded:	= 28.5%

Experiment 5:

The epothilones according to the invention are tested with cell cultures (Table 2) and for promoting polymerization (Table 3).

Table 2:

Epothilone test with cell cultures

epothilone	A	B	C	D	E	F
	493	507	477	491	509	523
	IC-50 [ng/mL]					
mouse fibroblasts L 929	4	1	100	20	20	1.5
human tumor cell lines:						
HL-60 (leukemia)	0.2	0.2	10	3	1	0.3
K-562 (leukemia)	0.3	0.3	20	10	2	0.5
U-937 (lymphoma)	0.2	0.2	10	3	1	0.2
KB-3.1 (cervical cancer)	1	0.6	20	12	5	0.5
KB-V1 (cervical cancer multires)	0.3	0.3	15	3	5	0.6
A-498 (kidney cancer)	-	1.5	150	20	20	3
A-549 (lung cancer)	0.7	0.1	30	10	3	0.1

Table 3:

Polymerization test with epothilones

Parameter: time to the half-maximum polymerization of the control

measurement	w	x	y	z	mean. [s]	mean. [%]
control	200	170	180	210	190	100
epothilone A	95	60	70	70	74	39
epothilone B		23	25	30	26	14
epothilone C	125	76	95	80	94	49
epothilone D	125	73	120		106	56
epothilone E	80	60	50	45	59	31
epothilone F	80	40	30	50	50	26

Standard test with 0.9 mg of tubulin/mL and 1 μ M of sample concentration

The polymerization test is an in-vitro test with purified tubulin from pig brain. The evaluation is done photometrically. Polymerization-promoting substances, such as epothilones, shorten the time elapsed till the half-maximum polymerization, that is, the shorter the time, the more effective the compound. w, x, y and z are four independent experiments and the relative effectiveness is expressed in the last column in % of the control; again, the lowest values show the best effectiveness. Thus, the list corresponds quite accurately to that found in the cell cultures.

Our reference: 8824

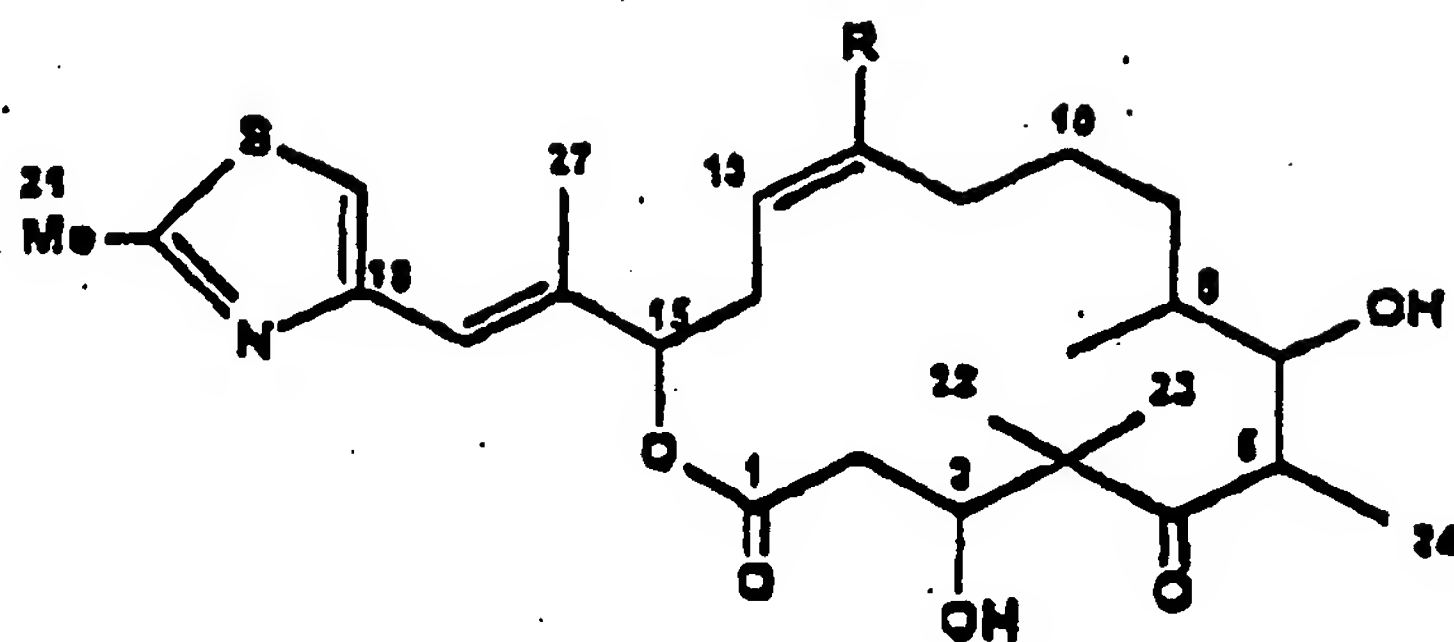
New International Patent Application PCT/EP

Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF)

Patent Claims

1. Epothilones, obtainable by the fact that
 - (a) *Sorangium cellulosum* DSM 6773 is cultured in the presence of an adsorber resin in the known manner,
 - (b) the adsorber resin is separated from the culture and is washed with a water/methanol mixture,
 - (c) the washed adsorber resin is eluted with methanol and the eluate evaporated to a crude extract,
 - (d) the obtained concentrate is extracted with ethyl acetate, the extract is evaporated and partitioned between methanol and hexane,
 - (e) the methanolic phase is evaporated to a raffinate and the concentrate is fractionated on a Sephadex column,
 - (f) a fraction with metabolic products of the microorganism used is recovered,
 - (g) the recovered fraction is chromatographed on a C18-reverse-phase, with a methanol/water mixture and it is recovered in the time sequence
 - after a first fraction with epothilone A and
 - a second fraction with epothione [sic] B
 - a third fraction with a first additional epothilone and
 - a fourth fraction with a second additional epothilone and
 - (h1) the epothilone of the first additional fraction and/or
 - (h2) the epothilone of the second additional fraction is isolated.
2. Epothilone having the molecular formula $C_{26}H_{39}NO_5S$, characterized by the 1H and ^{13}C -NMR spectrum according to Table 1.

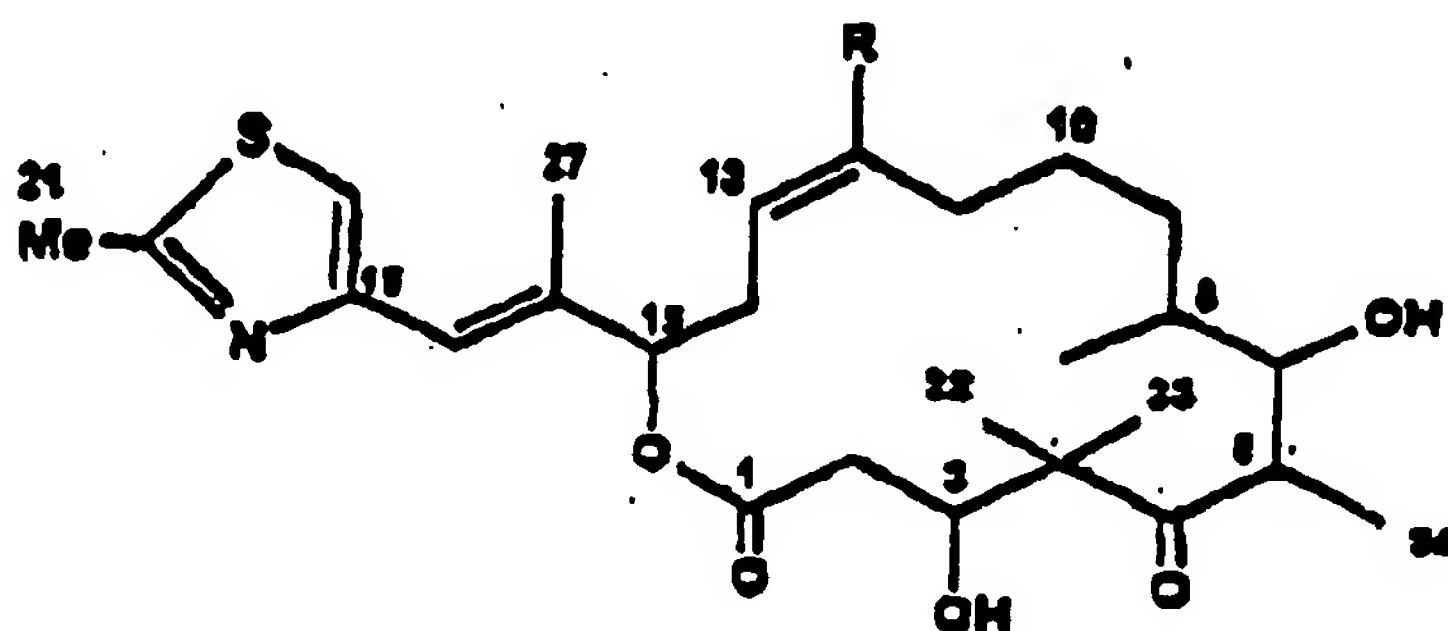
3. Epothilone C having the formula:



epothilone C R = H

4. Epothilone is the molecular formula $C_{27}H_{41}NO_3S$, characterized by the 1H and ^{13}C -NMR spectrum according to Table 1.

5. Epothilone D having the formula:



epothilone D R = CH₃

6. Biotransformant of epothilone A, obtainable by the fact that
- Sorangium cellulosum* DSM 6773 is cultured in the presence of an adsorber resin in the known manner, is separated from the adsorber resin and optionally the total amount or a part of the separated culture is treated with a methanolic solution of epothilone A,

- (b) the culture to which epothilone A was added is incubated and then an adsorber resin is added,
- (c) the adsorber resin is separated from the culture, eluted with methanol and the eluate is evaporated to a crude extract,
- (d) the crude extract is partitioned between ethyl acetate and water, the ethyl acetate phase is separated and evaporated to an oil,
- (e) the oil is chromatographed on a reverse-phase under the following conditions:
 - column material: Nucleosil 100 C-18 7 μ m
 - column dimension: 250 x 16 mm
 - solvent: methanol/water = 60:40
 - flow rate: 10 mL/min

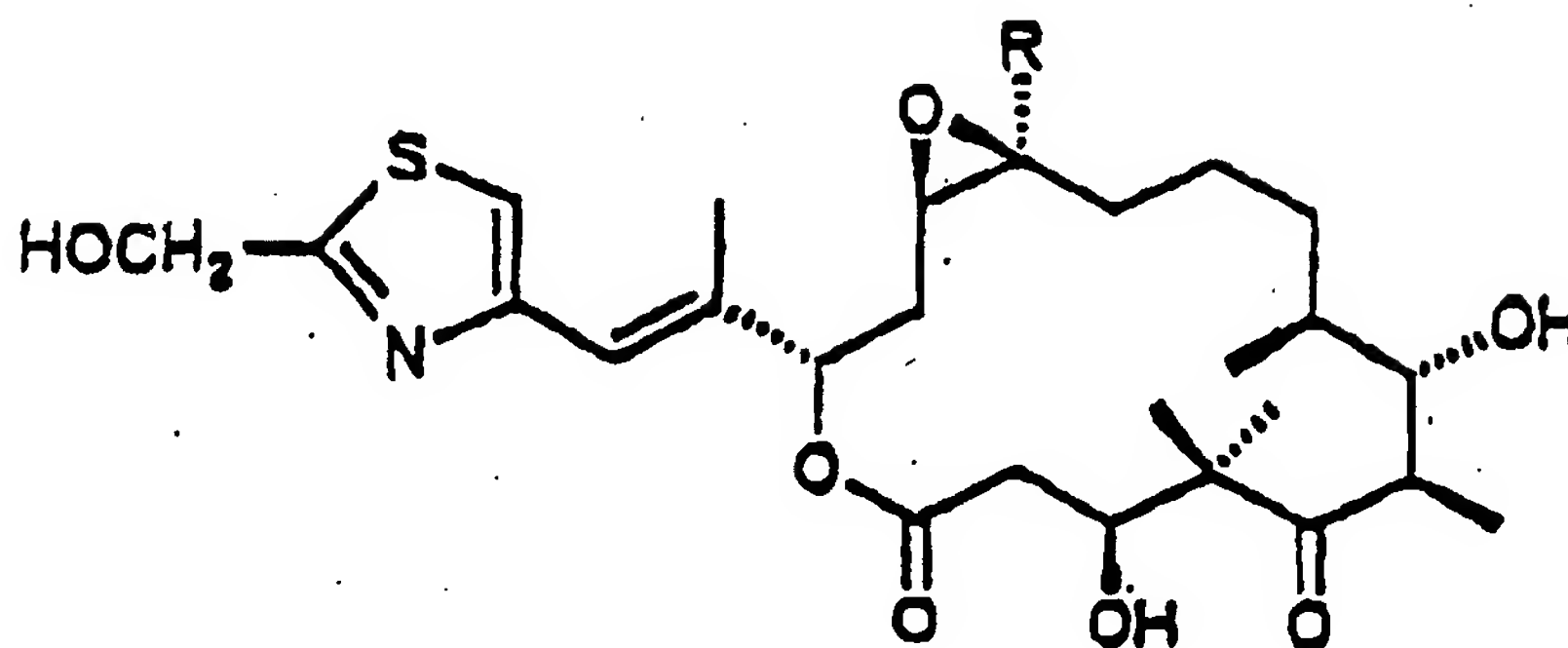
and fractions which contain a biotransformant, which can be detected by UV absorption at 254 nm, having an R_f value of 20 minutes, are separated and the biotransformant isolated.

7. Biotransformant of epothilone A according to Claim 6, obtainable by separating in step (a) a culture which is three or four or more days old.

8. Biotransformant of epothilone A according to Claim 6 or 7, obtained by incubating the mixture in step (b) for one or two or more days.

9. Compound having molecular formula $C_{26}H_{39}NO_7S$, characterized by the following 1H -NMR spectrum (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 2.38 (2- H_d), 2.51 (2- H_d), 4.17 (3-H), 3.19 (6-H), 3.74 (7-H), 1.30-1.70 (8-H, 9- H_2 , 10- H_2 , 11- H_2), 2.89 (12-H), 3.00 (13-H), 1.88 (14- H_d), 2.07 (14- H_d), 5.40 (15-H), 6.57 (17-H), 7.08 (19-H), 4.85 (21- H_2), 1.05 (22- H_3), 1.32 (23- H_3), 1.17 (24- H_3), 0.97 (25- H_3), 2.04 (27- H_3).

10. Compound (epothilone E) having the formula:



epothilone E R = H

11. Biotransformant of epothilone B, obtainable by the fact that
- Sorangium cellulosum* DSM 6773 is cultured in the presence of an adsorber resin in the known manner, separated from the adsorber resin and optionally a methanolic solution of epothilone B is added to the total amount or to a part of the separated culture,
 - the culture to which the epothilone B was added is incubated and then adsorber resin is added,
 - the adsorber resin is separated from the culture, eluted with methanol and the eluate is evaporated to a crude extract,
 - the crude extract is partitioned between ethyl acetate and water, the ethyl acetate phase is separated and evaporated to an oil,
 - the oil is chromatographed on a reverse-phase under the following conditions:
 column material: Nucleosil 100 C-18 7 μ m
 column dimension: 250 x 16 mm
 solvent: methanol/water = 60:40
 flow rate: 10 mL/min

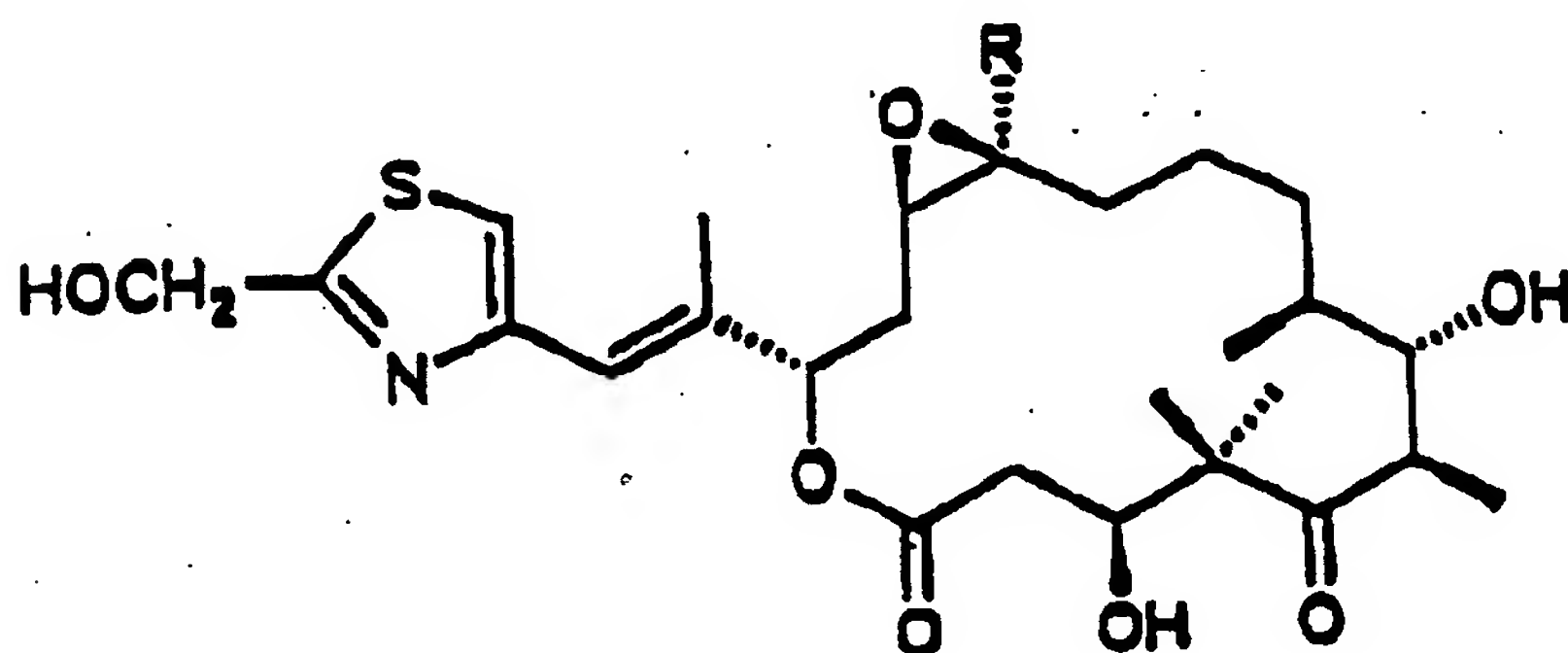
and fractions with a biotransformant content, which can be detected by UV absorption at 254 nm, with an R_f value of 24.5 minute, are separated and the biotransformant isolated.

12. Biotransformant according to Claim 11, obtainable by separating a culture in step (a), which is two or four or more days old.

13. Biotransformant according to Claim 11 or 12, obtainable by incubating the mixture at step (b) for one or two or more days.

14. Compound having the molecular formula $C_{27}H_{41}NO_7S$, characterized by the following 1H -NMR spectrum (300 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 2.37$ (2- H_a), 2.52 (2- H_b), 4.20 (3-H), 3.27 (6-H), 3.74 (7-H), 1.30-1.70 (8-H, 9- H_2 , 10- H_2 , 11- H_2), 2.78 (13-H), 1.91 (14-H), 2.06 (14- H_b), 5.42 (15-H), 6.58 (17-H), 7.10 (19-H), 4.89 (21- H_2), 1.05 (22- H_3), 1.26 (23- H_3), 1.14 (24- H_3), 0.98 (25- H_3), 1.35 (26- H_3), 2.06 (27- H_3).

15. Compound (epothilone F) having the formula:



epothilone F $R = CH_3$

16. Agent for plant protection in agriculture and forestry and/or gardening, consisting of one or several compounds according to one of the previous claims, or of one or several of these compounds in addition to one or several of the usual carrier(s) and/or diluent(s).

17. Therapeutic agent, especially for use as a cytostatic agent, consisting of one or several of the compounds according to one or several of the previous Claims, or of one or several of the previous compounds according to one or several of the previous Claims in addition to one or several of the usual carrier(s) and/or diluent(s).

Figure 1. HPLC analysis of an XAD eluate at the end of a fermentation
 Epothilon = Epothilone

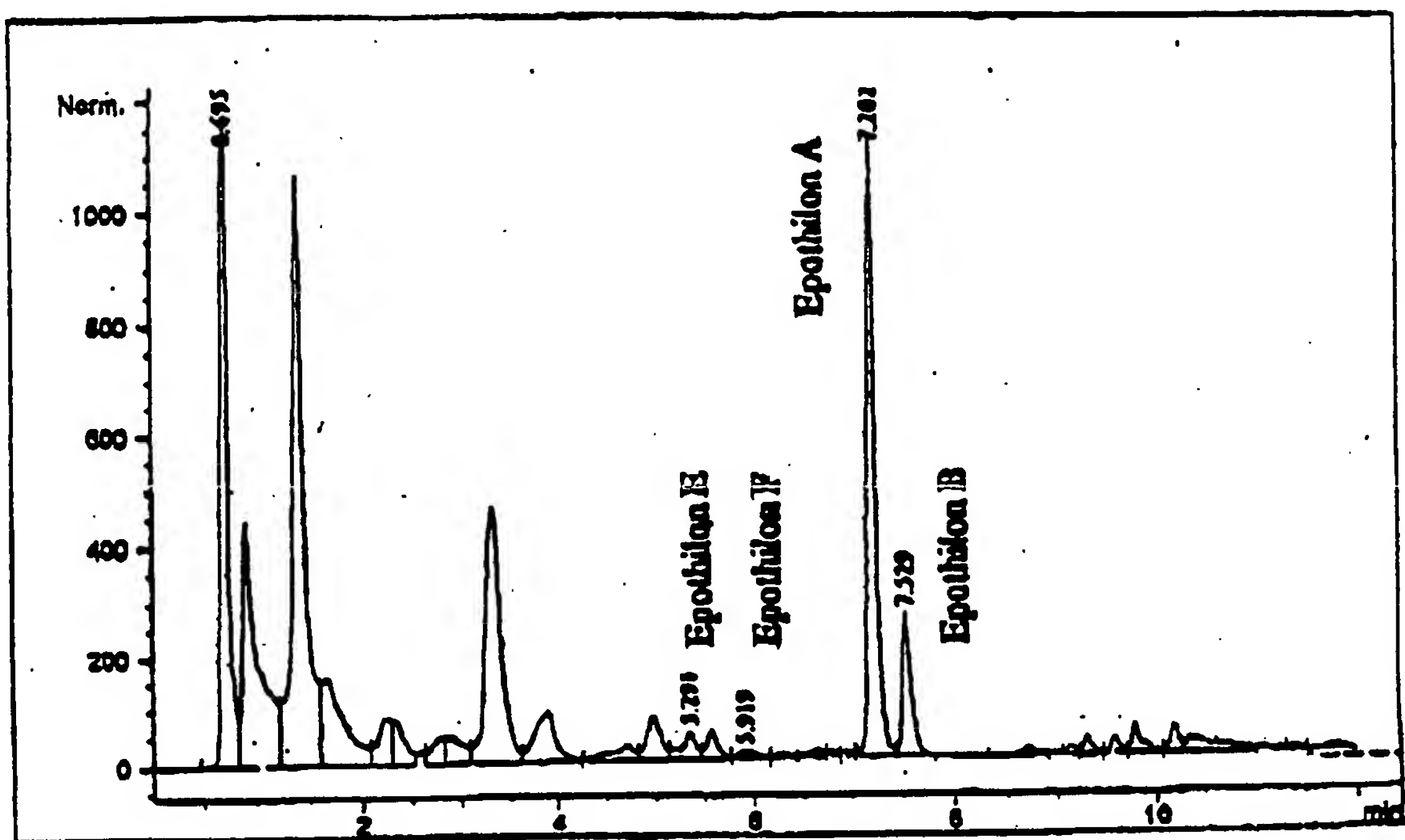


Figure 2. Enrichment of epothilone E and F in a fermentation broth after feeding a mixture of epothilone A and B, analyzed after 48 hour of incubation
 Epothilon = Epothilone

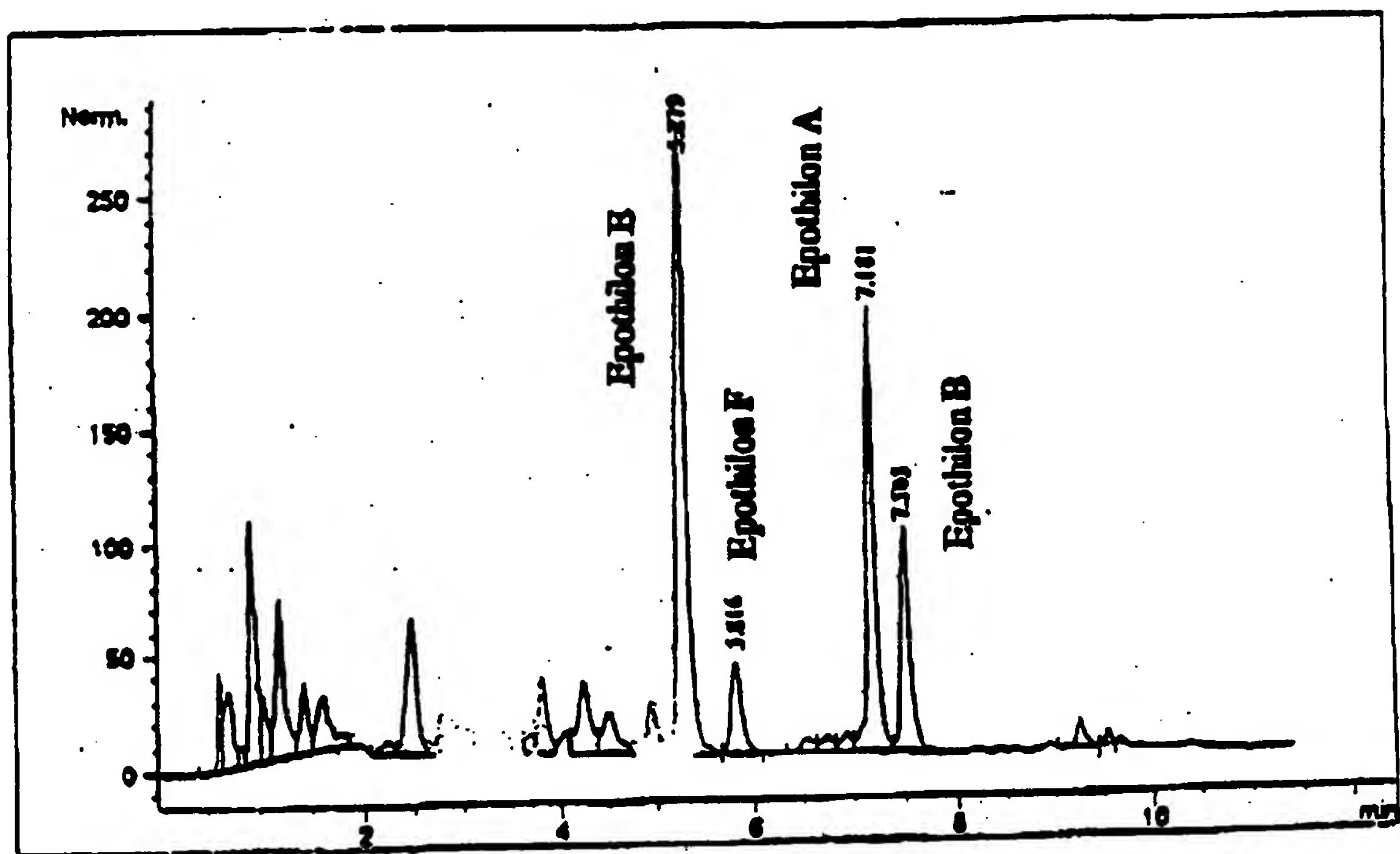


Figure 3. Kinetics of biotransformation of epothilone A to epothilone E by *Sorangium cellulosum* So ce90

Key:

Epothilon = Epothilone

on top: biotransformation of epothilone A

ordinate: epothilone [mg/L]

abscissa: incubation time [hours]

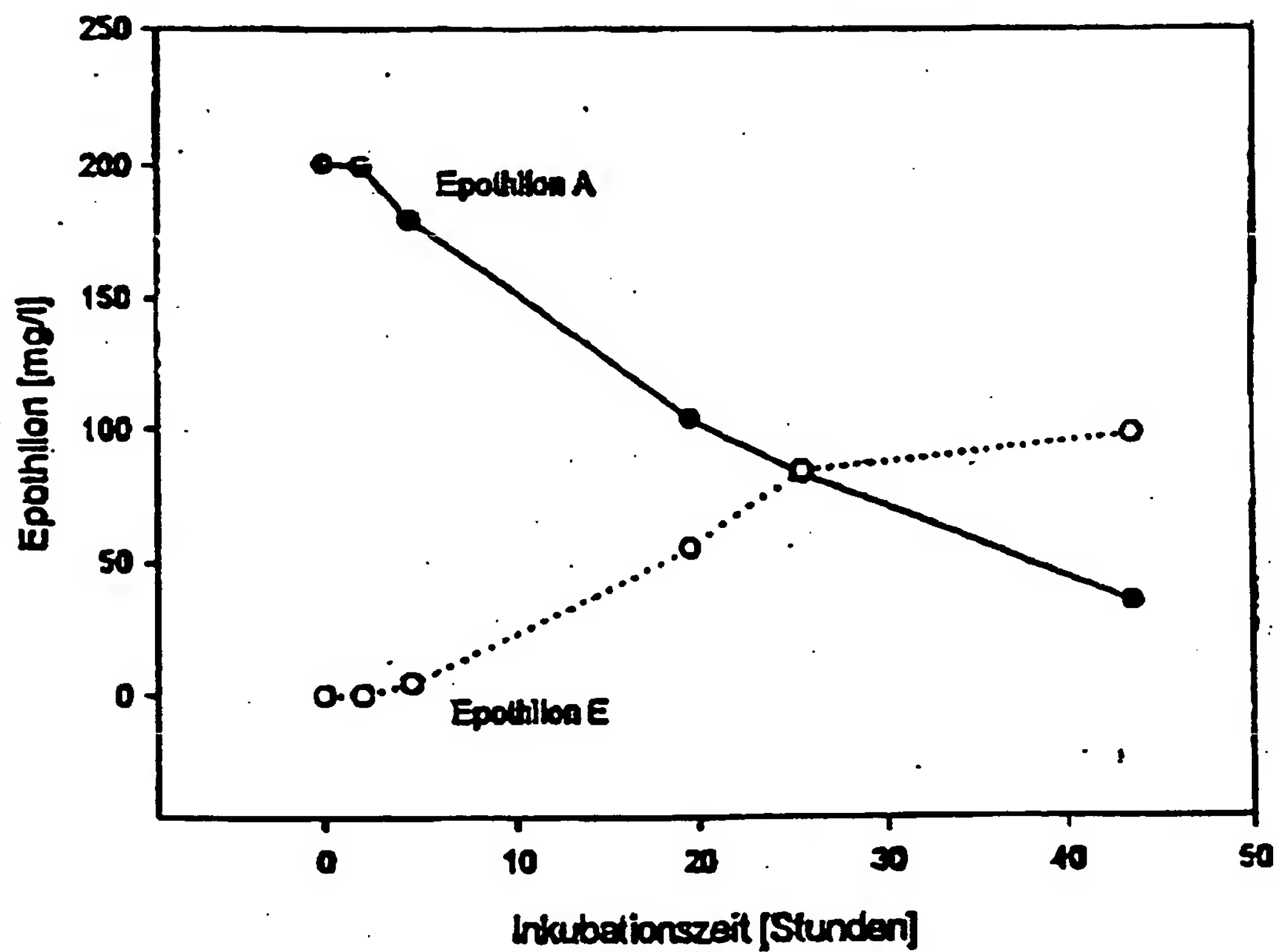


Figure 4

Key:

on top: biotransformation of epothilone A to epothilone E

inside the Figure: total epothilone

epothilone A

epothilone E

ordinate: epothilones [%]

abscissa: incubation time [h]

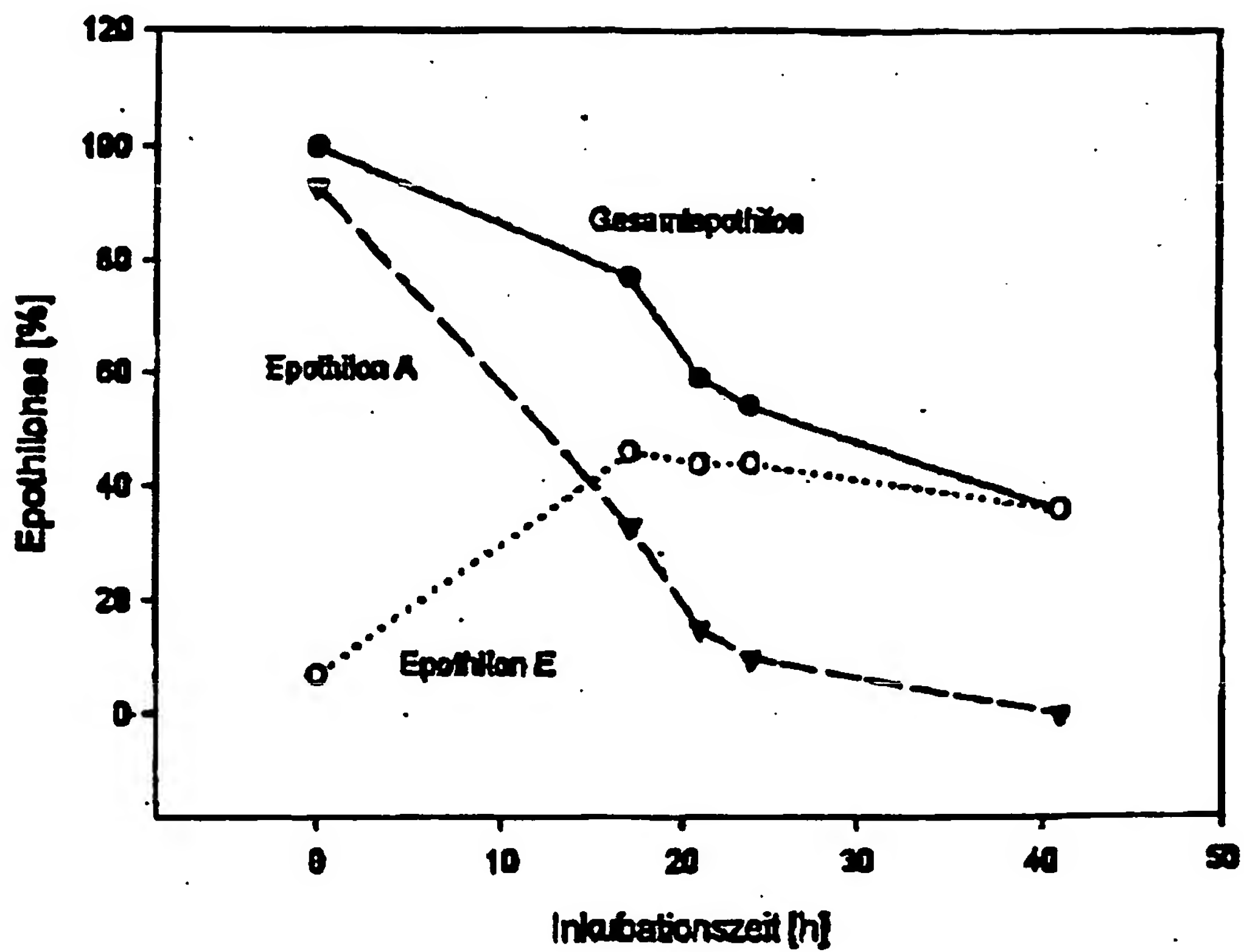


Figure 5

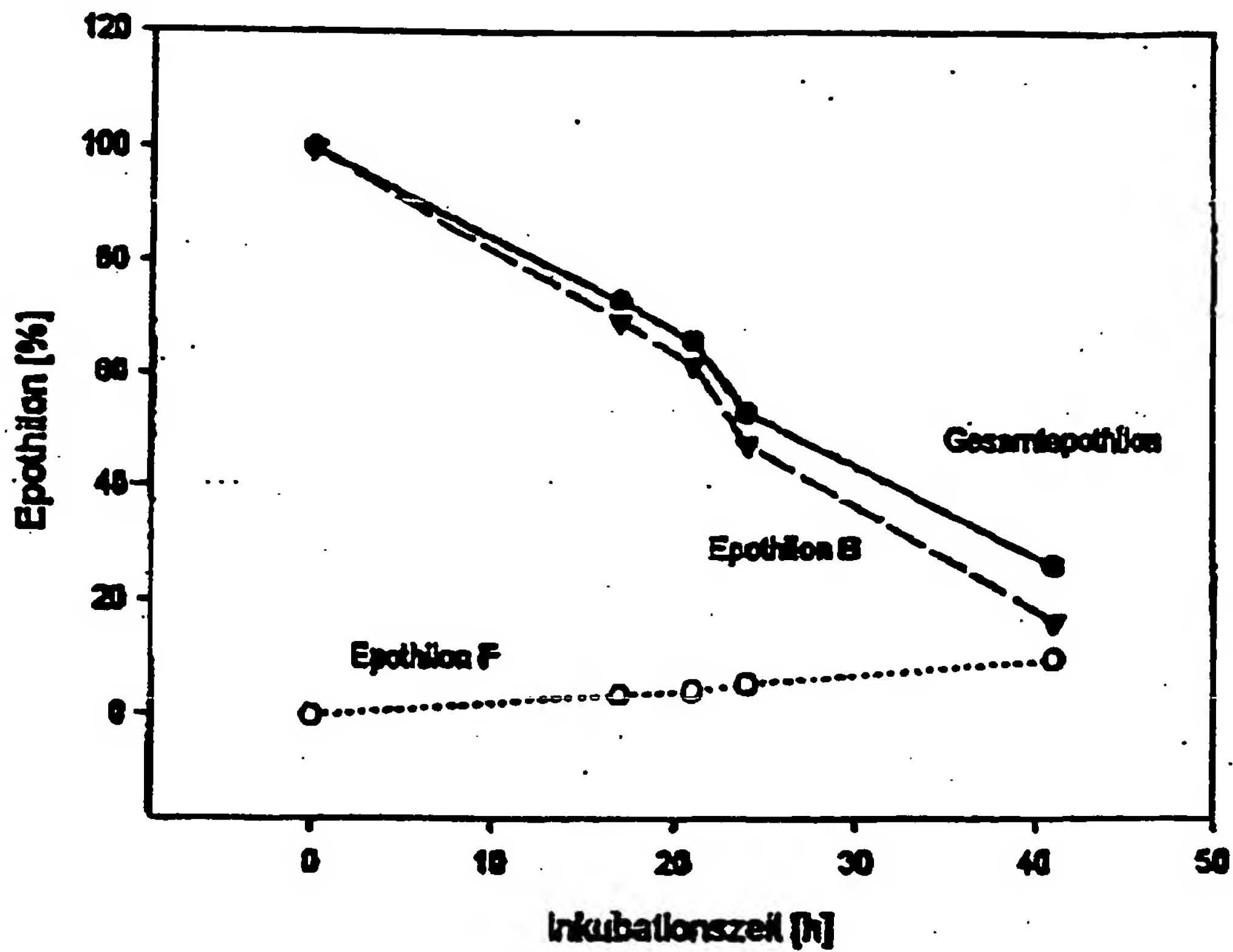
Key:

on top: biotransformation of epothilone B to epothilone E [corrected to F]

inside the Figure: total epothilone
 epothilone B
 epothilone F

ordinate: epothilones [%]

abscissa: incubation time [h]



November 17, 1997/he

Abstract

Our reference: 8824-GBF

New International Patent Application PCT/EP

based on DE (1) 96 47 580.5 and DE (1) 97 07 506.1

Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF)

Epothilones C, D, E and F, preparation and agents

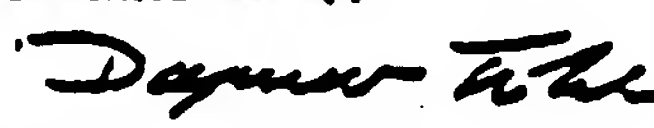
The present invention concerns epothilones C, D, E and F, their preparation as well as their application for the preparation of therapeutic agents and agents for plant protection

**BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE**

INTERNATIONAL FORM

**Gesellschaft für
Biotechnologische
Forschung mbH
Mascheroder Weg 1
3300 Braunschweig**

VIABILITY STATEMENT
Issued pursuant to Rule 10.3 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
Identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR		II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Name: Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH Address: Mascheroder Weg 1 3300 Braunschweig		Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 6773 Date of the deposit or of the transfer ¹ 1991-10-28	
III. VIABILITY STATEMENT			
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 1991-10-28 . ² On that date, the said microorganism was (<input checked="" type="checkbox"/>) ³ viable () ³ no longer viable			
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED⁴			
IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY			
Name: DSM DEUTSCHE SAMMLUNG VON MICROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1 B D-3300 Braunschweig		Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: 1991-11-08	

¹ Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).

² In the cases referred to in Rule 10.3(a) (II) and (III), refer to the most recent viability test.

³ Mark with a cross the applicable box.

⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

**BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE**

INTERNATIONAL FORM

Gesellschaft für
Biotechnologische
Forschung mbH
Mascheroder Weg 1
3300 Braunschweig

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
Issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR So ce 90	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 6773
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR TAXONOMIC DESIGNATION	
<p>The microorganism identified under I. above was accompanied by:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/>) a scientific description <input checked="" type="checkbox"/>) a proposed taxonomic designation</p> <p>(Mark with a cross where applicable)</p>	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
<p>This International Depositary Authority accepts this microorganism identified under I. above, which was received by it on 1991-10-28 (Date of original deposit)¹</p>	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
<p>The microorganism identified under I. above was received by this International Depositary Authority on (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).</p>	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
<p>Name: DSM-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Address: Mascheroder Weg 1 B D-3300 Braunschweig</p>	<p>Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):</p> <p align="center"><i>Detmar Tittel</i></p> <p>Date: 1991-11-05</p>

¹ Where Rule 4.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was required.

Epothilone E and F

Production strain:

The production strain *Sorangium cellulosum* So ce90 was isolated in July 1985 at GBF from a soil sample from the banks of the Zambesi and deposited on 10/28/91 at the Deutsche Sammlung für Mikroorganismen [German Collection for Microorganisms] under No. DSM 6773.

The characterization of the producing organisms and the culturing conditions are described in: Höfle, G.; N. Bedorf, K. Gerth & H. Reichenbach: Epothilones, their preparation as well as agents containing them, DE 41 38042 A1, laid open on May 27, 1993.

Formation of epothilones E and E [sic] during fermentation:

Epothilone E and F, new biotransformation products of epothilones A and B

Production strain:

The production strain, *Sorangium cellulosum* So ce90, was isolated from a soil sample collected in July 1985 at the GBF at the banks of the Zambesi and was deposited on 10/28/91 in the Deutsche Sammlung für Mikroorganismen [German Collection for Microorganisms] under No. DSM 6773.

The characterization of the producing organism as well as the culturing conditions are described in:

Höfle, G.; N. Bedorf, K. Gerth & H. Reichenbach: Epothilones, their methods of preparation as well as agents containing them. DE 41 38 042 A1, laid open on May 27, 1993.

Formation of epothilones E and E [sic] during fermentation:

A typical fermentation runs as follows: a 100 L bioreactor is filled with 60 L medium (0.8% starch; 0.2% glucose; 0.2% soy meal; 0.2% yeast extract; 0.1% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0.1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 8 mg/L of Fe-EDTA; pH 7.4). In addition, 2% adsorber resin (XAD-16, Rohm & Haas) was added. The medium is sterilized by autoclaving (2 hours, 120°C). Inoculation is done with 10 L of a preculture raised in a shaking flask in the same medium (in addition: 50 mM HEPES buffer pH 7.4) (160 rpm, 30°C). The fermentation is carried out at 32°C at a stirrer velocity of 500 rpm and aeration with 0.2 NL per m^3 and hour. The

pH value is kept at 7.4 by the addition of KOH. The fermentation takes 7 to 10 days. The formed epothilones are bound to the adsorber resin continuously during the fermentation. After separation of the culture broth (for example, by sieving in a process filter) the resin is washed with 3 bed volumes of water and eluted with 4 bed volumes of methanol. The eluate is evaporated to dryness and is taken up in 700 mL of methanol.

HPLC analysis of the XAD eluate:

With respect to the initial volume of the reactor (70 L), the eluate is concentrated 100:1. The analysis is carried out with an HPLC unit 1090 made by Hewlett Packard. A Microbore column (125/2 Nucleosil 120-5 C₁₈) made by Machery-Nagel (Düren) is used for separating the components. The elution is done with a water/acetonitrile gradient from initially 75:25 to 50:50 after 5.5 minutes. This ratio is then maintained till the 7th minute and then increased to 100% acetonitrile up to the 10th minute.

The measurement is carried out at a wavelength of 250 nm and with a band width of 4 nm. The diode array spectra are measured in the wavelength region from 200 to 400 nm. In the XAD eluate, two new substances are noticed with R_f of 5.29 and R_f of 5.91; the adsorption spectra of these are identical to those of epothilones A and B, respectively (Figure 1; e corresponds to A, F corresponds to B). These substances are formed only in traces under the given fermentation conditions.

Biotransformation of epothilone A and B to epothilone E and F:

For the directed biotransformation, a 4-day old culture of *So ce90*, 500 mL, is used, kept with adsorber resin. Of this, 250 mL is introduced into a sterile 1 L Erlenmeyer flask leaving the XAD behind. After that, a methanolic solution of a mixture of a total of 50 mg of epothilone A + B is added and the flask is [incubated] for two days at 30°C and 200 rpm on a shaking chest [literal]. The formation of epothilone E and F is analyzed directly on 10 µL of the centrifuged culture supernatant (Figure 2). The conversion occurs only in the presence of the cells and is dependent on the cell density used and on the time. The kinetics of conversion for epothilone A is shown in Figure 3.

Isolation of epothilone E and F

To isolate epothilone E and F, the shaking flask batches from the biotransformation (see above) are combined and are shaken for 1 hour with 20 mL of XAD-16. The XAD is recovered by sieving and is eluted with 200 mL of methanol. The eluate is evaporated in vacuum to 1.7 g crude extract. This is then partitioned between 30 mL of ethyl acetate and

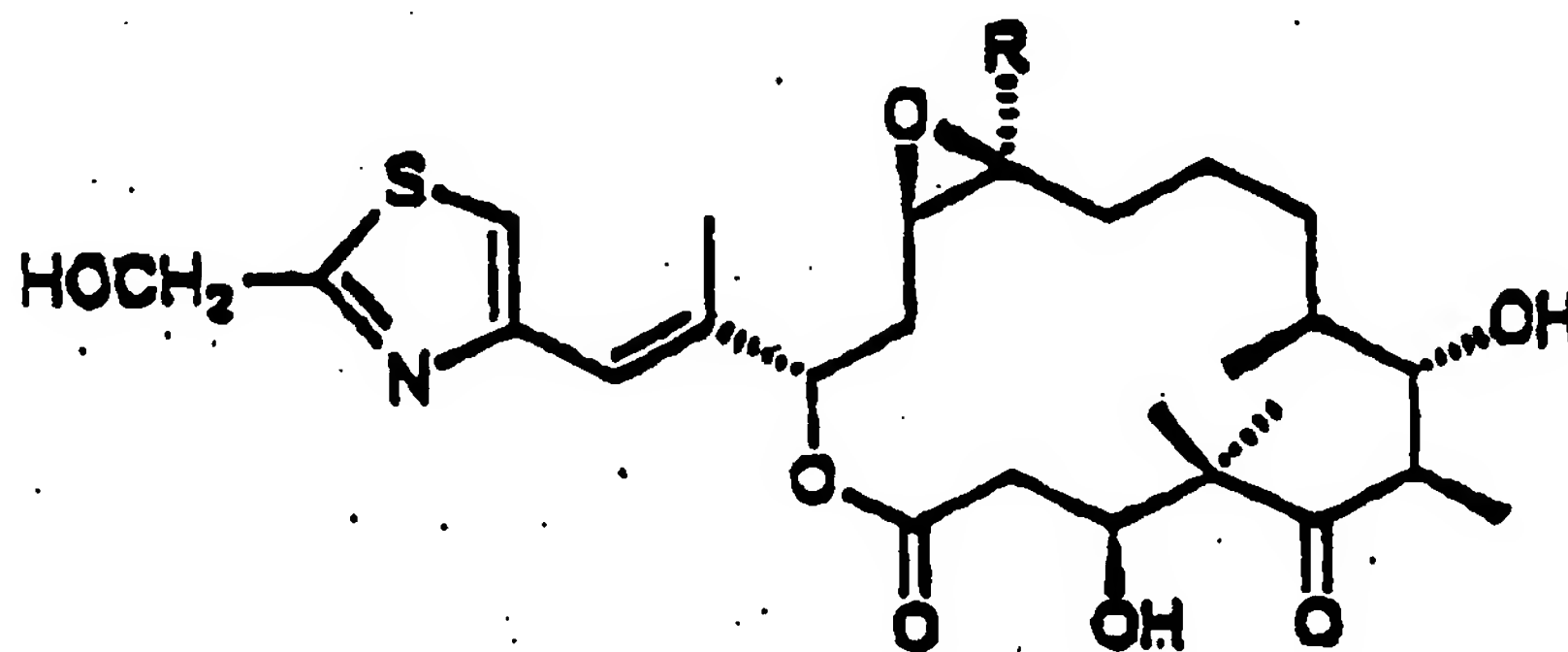
100 mL of water. Upon evaporation in vacuum, 330 mg of an oily residue is obtained from the ethyl acetate phase. This is chromatographed in five runs through a 250 x 20 mm RP-18 column (solvent: methanol/water 58:42, detection 254 nm).

Yield:	Epothilone E	50 mg
	F	10 mg

Biological effect of epothilone E:

Using cell cultures, the concentration which reduces growth by 50% (IC_{50}) was determined, and the results were compared with the values for epothilone A.

<u>cell line</u>	<u>IC_{50} (ng/mL)</u>	
	<u>epothilone E</u>	<u>epothilone A</u>
HeLa. KB-3.1 (human)	5	1
mouse fibroblasts, L929	20	4



Epothilone E R = H

Epothilone F R = CH₃

Epothilone E

C₂₆H₃₉HO₇S [509]

ESI-MS: (positive ions): 510.3 for [M+H]⁺

TLC: R_f = 0.58

TLC: aluminum foil 60 F 254 Merck. Solvent: dichloromethane/methanol = 9:1

Detection: UV absorption at 254 nm. Spraying with vanillin-sulfuric acid reagent; blue-gray coloration upon heating to 120°C

HPLC: R_t = 5.0 min

Column: Nucleosil 100 C-18 7 μm, 250 x 4 mm

Solvent: methanol/water = 60:40

Flow rate: 1.2 mL/min

Detection: diode array

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 2.38 (2-H), 2.51 (2-H), 4.17 (3-H), 3.19 (6-H), 3.74 (7-H), 1.30 - 1.70 (8-H, 9-H, 10-H, 11-H), 2.89 (12-H), 3.00 (13-H), 1.88 (14-H), 2.07 (14-H), 5.40 (15-H), 6.57 (17-H), 7.08 (19-H), 4.85 (21-H), 1.05 (22-H), 1.32 (23-H), 1.17 (24-H), 0.97 (25-H), 2.04 (27-H).

Epothilone F

C₂₇H₄₁NO₇S [523]

ESI-MS: (positive ions): 524.5 for [M+H]⁺

TLC: R_f = 0.58

TLC: aluminum foil 60 F 254 Merck. Solvent: dichloromethane/methanol = 9:1

Detection: UV absorption at 254 nm. Spraying with vanillin-sulfuric acid reagent; blue-gray coloration upon heating to 120°C

HPLC: R_t = 5.4 min

Column: Nucleosil 100 C-18 7 μm, 250 x 4 mm

Solvent: methanol/water = 60:40

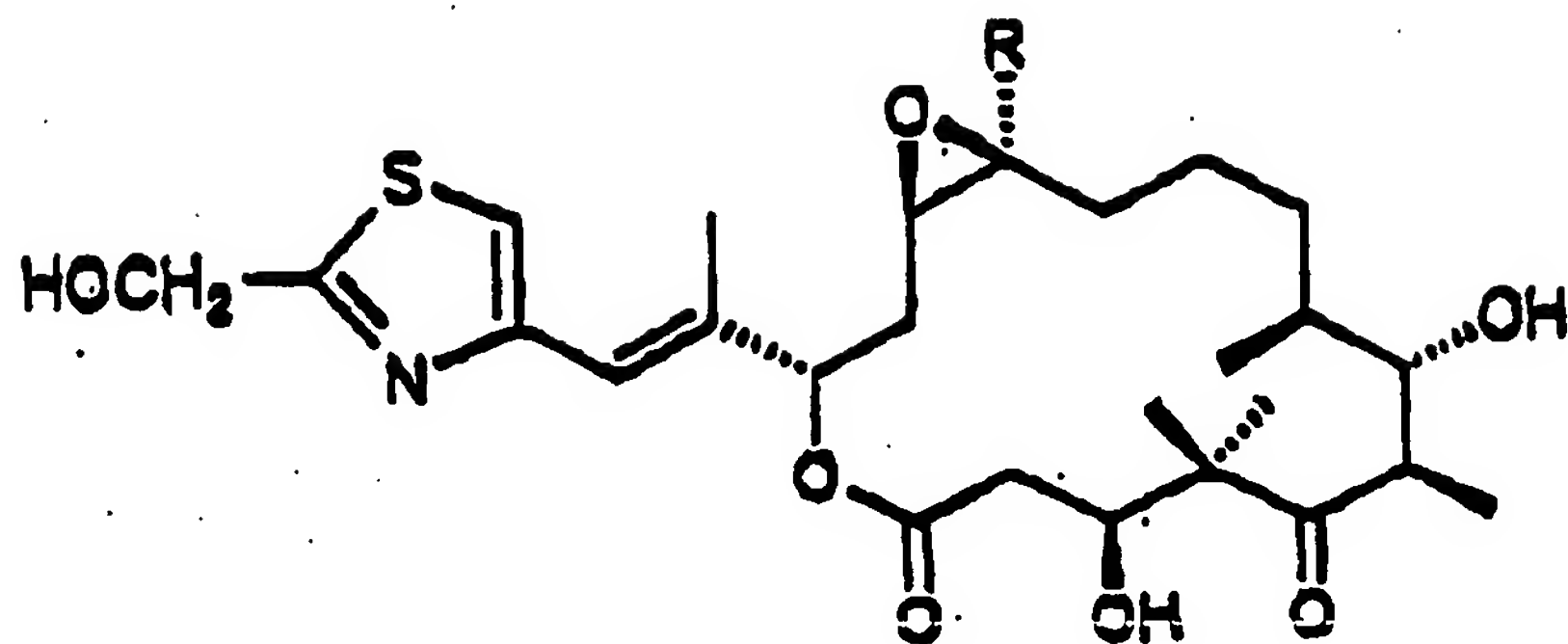
Flow rate: 1.2 mL/min

Detection: diode array

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 2.37 (2-H), 2.52 (2-H), 4.20 (3-H), 3.27 (6-H), 3.74 (7-H), 1.30 - 1.70 (8-H, 9-H, 10-H, 11-H), 2.78 (13-H), 1.91 (14-H), 2.06 (14-H), 5.42 (15-H), 6.58 (17-H), 7.10 (19-H), 4.89 (21-H), 1.05 (22-H), 1.26 (23-H), 1.14 (24-H), 0.98 (25-H), 1.35 (26-H), 2.06 (27-H).

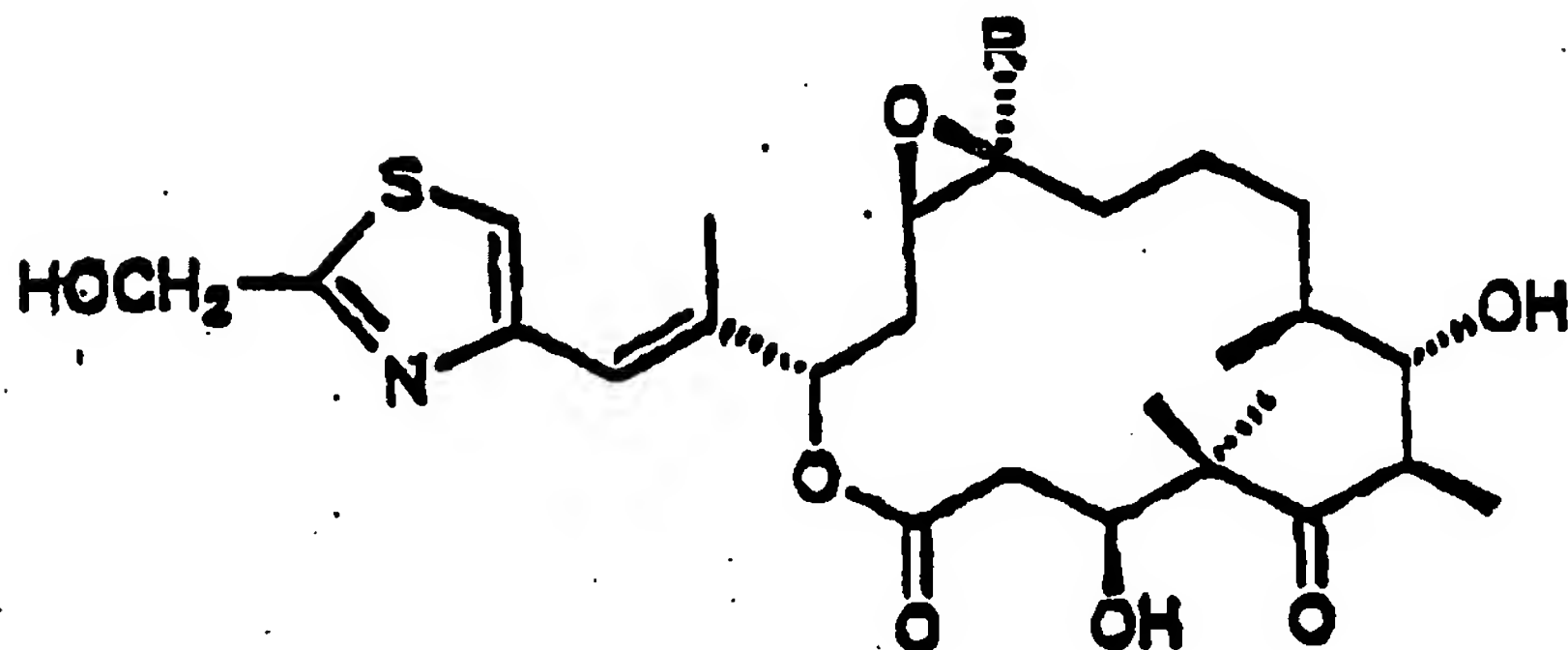
Patent Claims

1.



Epothilone E R = H

2.



Epothilone F R = CH₃

Figure 1. HPLC analysis of an XAD eluate at the end of a fermentation
 Epothilon = Epothilone

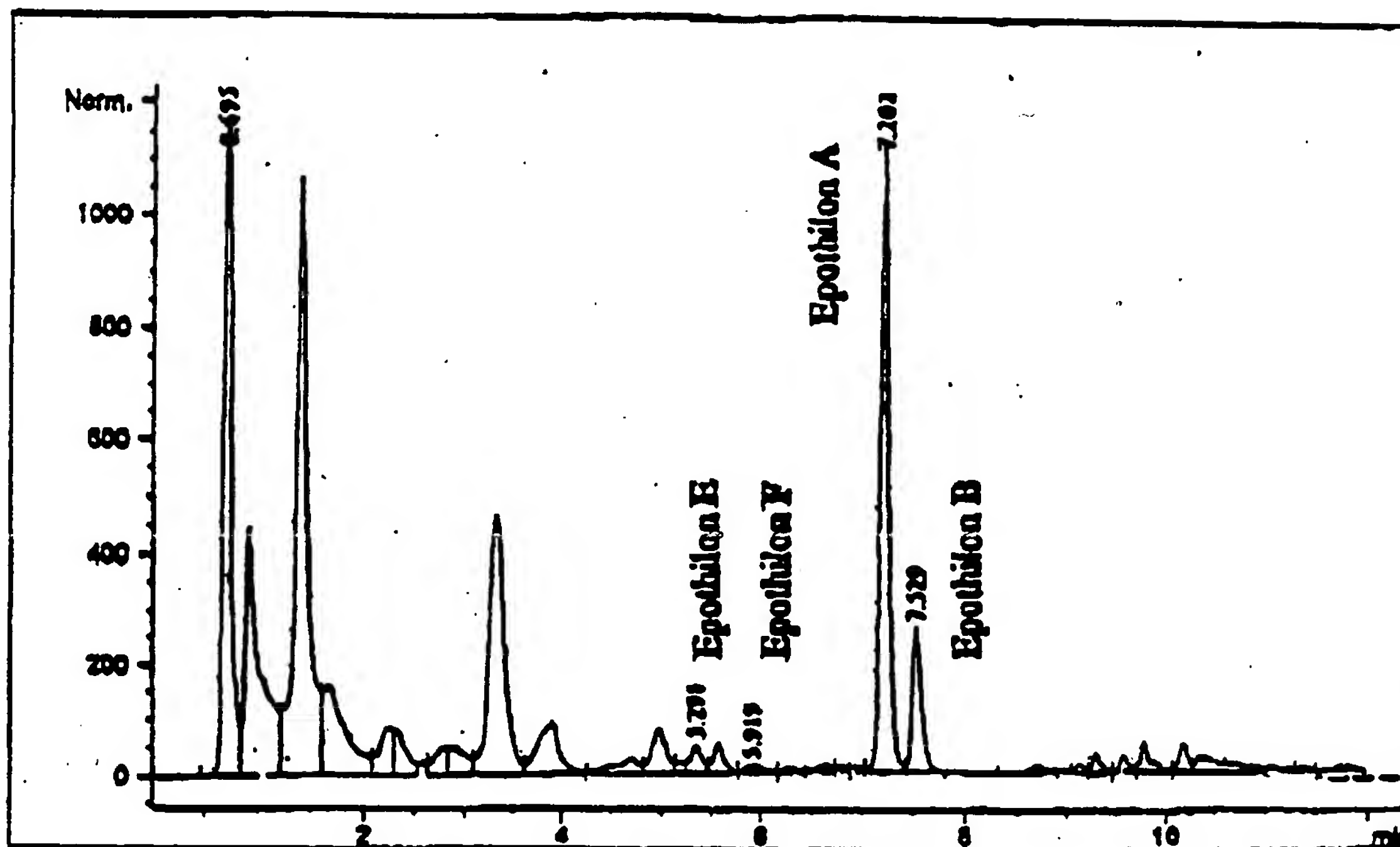


Figure 2. Enrichment of epothilone E and F in a fermentation broth after feeding a mixture of epothilone A and B, analyzed after 48 hour of incubation
 Epothilon = Epothilone

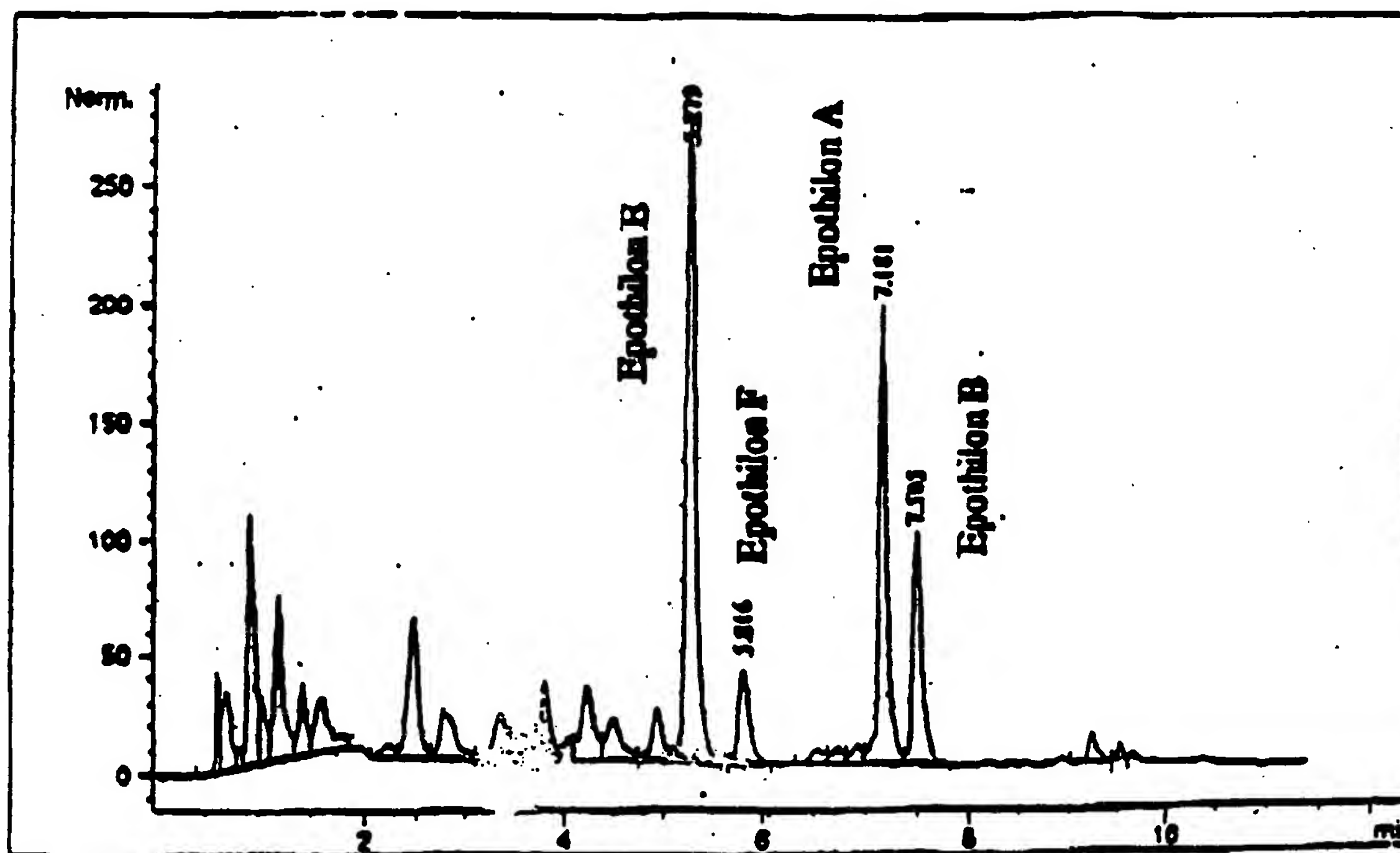


Figure 3. Kinetics of biotransformation of epothilone A to epothilone E by *Sorangium cellulosum* So ce90

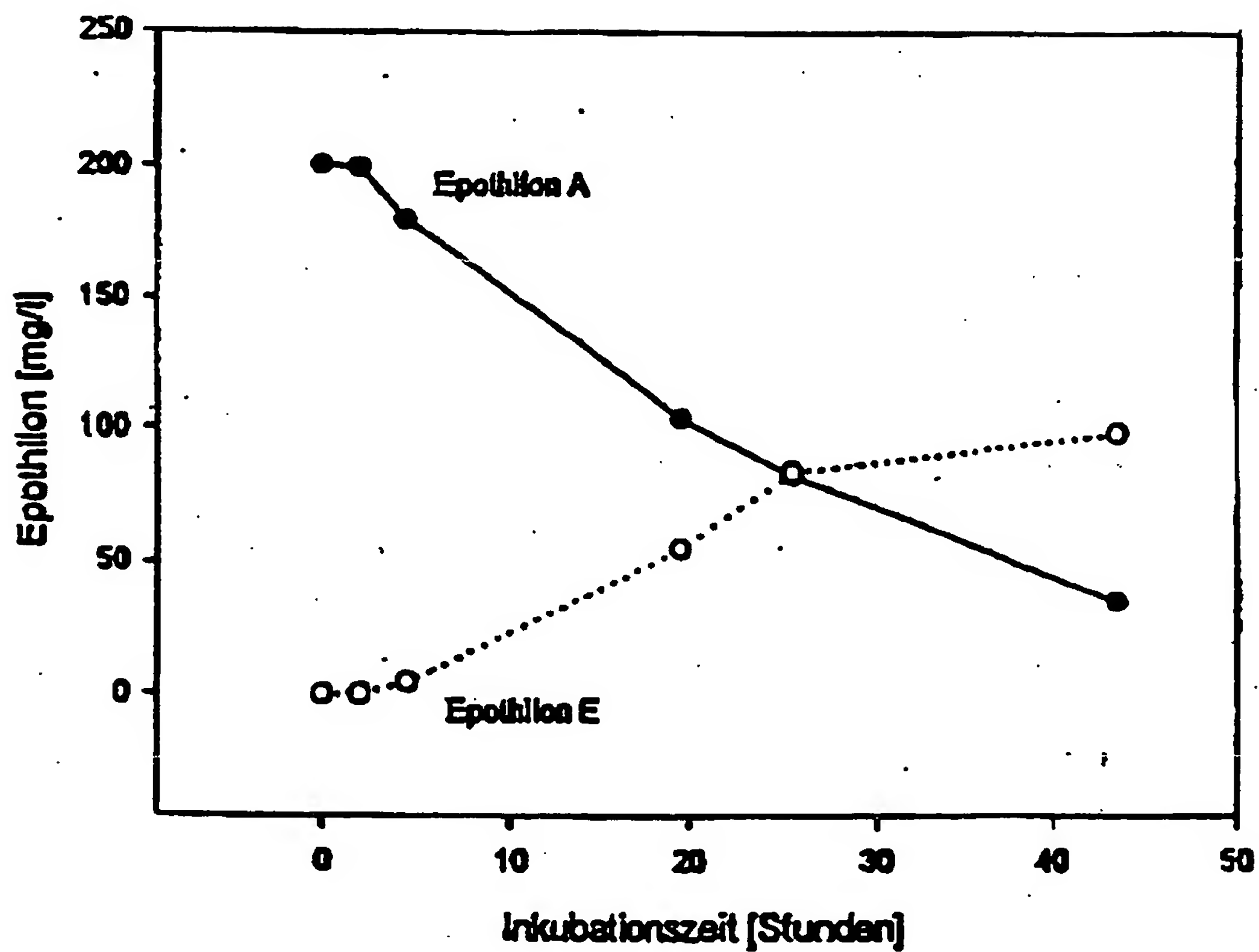
Key:

Epothilon = Epothilone

on top: biotransformation of epothilone A

ordinate: epothilone [mg/L]

abscissa: incubation time [hours]



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.